

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



EFFECTO DE UN PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO EN  
RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

TESIS DOCTORAL DE:  
**SANDRA FERNÁNDEZ VALLINAS**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:  
**M<sup>a</sup> AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO**  
**MARTA MIGUEL CASTRO**

Madrid, 2013

©Sandra Fernández Vallinas, 2013





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología**



**EFFECTO DE UN PRODUCTO RICO EN FIBRA  
SOLUBLE DE CACAO EN RATAS  
ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Sandra Fernández Vallinas**

**Madrid, 2013**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología**



**EFFECTO DE UN PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE  
CACAO EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

Memoria presentada por:

**Sandra Fernández Vallinas**

Para optar al grado de **Doctor en Farmacología**

Directoras:

**Dra. M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre de Artiñano**

Catedrática en Farmacología

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

**Dra. Marta Miguel Castro**

Científico Titular

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

Centro Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de  
Madrid



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología**



**M<sup>a</sup> AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO, CATEDRÁTICA DE FARMACOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.**

**Y**

**MARTA MIGUEL CASTRO, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.**

**HACEN CONSTAR:**

Que el presente trabajo titulado **"Efecto de un producto rico en fibra soluble de cacao en ratas espontáneamente hipertensas"**, que constituye la Memoria que presenta la Licenciada **Sandra Fernández Vallinas** para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 3 de Abril de 2013

Fdo. M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre de Artiñano

Fdo. Marta Miguel Castro





*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de las Doctoras M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre de Artiñano y Marta Miguel Castro, a las que quiero agradecer de manera muy especial su confianza en mí para llevar a cabo este Proyecto, agradecerles su apoyo, su ánimo y su comprensión tan necesarios a lo largo de éste camino, que en ocasiones se ha hecho duro pero que ha llegado a su fin. Gracias de corazón, por tantas enseñanzas y dedicación, porque sin vuestra ayuda y estima, tanto en lo profesional como en lo personal, éste sueño no hubiera sido posible.*

*Quisiera dar las gracias a la Universidad Complutense, por aceptarme como estudiante de Doctorado y poner a mi servicio todos sus recursos.*

*A la actual Directora del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, la Dra. Isabel Colado, por permitirme realizar en este Departamento mi Tesis Doctoral. A todos los componentes del Departamento de Farmacología, en especial al Dr. Juan Carlos Leza y al Dr. Francisco Pérez Vizcaíno, por su siempre amable disposición y colaboración en todo lo requerido. A la Dra. María Pilar Bringas, Directora Técnica del animalario de la Facultad de Medicina, y a todo el personal técnico y de servicios, por su colaboración y ayuda siempre que ha sido solicitada.*

*De igual forma agradecer la ayuda prestada al personal administrativo y técnico del Departamento de Farmacología. A M<sup>a</sup> Elena, por su siempre necesaria y eficaz ayuda administrativa. A Fernando y M<sup>a</sup> Luisa, por su ayuda siempre que ha sido necesaria. Y en especial a Manolo Bas, por su colaboración durante todo el desarrollo de la Tesis, parte de este trabajo también es tuyo, por enseñarme y ofrecerme tu ayuda, por animarme y hacer más divertidos y amenos los minutos de descanso, compartiendo "ese café" de Paco.*

*Mi agradecimiento también, a todos los compañeros del Departamento de Farmacología, por esos momentos compartidos durante el almuerzo, y en especial a Nieves y a Jorge, por su apoyo siempre que lo he necesitado.*

*A la Dra. Mar Quiñones, mi predecesora en el laboratorio y excompañera, por enseñarme y animarme en el comienzo de éste largo camino. A mi amiga y*

*compañera Noemi, por su apoyo, su alegría y optimismo, que en ocasiones tanto he necesitado, muchas gracias “Noe”, de corazón. Nunca olvidaremos estos intensos años compartidos, todo lo aprendido y los momentos vividos. Momentos buenos, muy buenos, y a veces desesperantes e inciertos, pero al final, superados y pasados.*

*Dar las gracias, también a los componentes del Departamento de Bioactividad y Análisis, del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por permitirme realizar en el, parte del trabajo desarrollado, de manera especial a Marta Garcés por su dedicación y ayuda, y por esos ratos de charlas y risas compartidos dentro y fuera del CIAL.*

*No quisiera dejar de agradecer también y de manera especial, tanto a mis profesores cómo a mis compañeras, de la Escuela de Ingeniería Agraria, y de la Facultad de Veterinaria de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad de León, porque allí tuvo lugar mi primer contacto con la investigación.*

*Quisiera dar las gracias de corazón a todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de ésta etapa desde diferentes lugares, pero siempre conmigo. A las “piripituscas” Patri, Lauri, Rosana, Lara, Iván, Vero, Bea, Olgui, y Vicky, que me han ayudado a desconectar y ha sonreír, y que me han dado ánimo en los peores momentos para seguir y ser fuerte. Al “equipo de Ingenieras” por esas cenas remember, y especialmente a tí Jaly, mi amiga del alma, mi confidente, mi compañera de penas y alegrías, gracias por animarme, por apoyarme y estar ahí siempre, siempre. A Naro y Ana, mis “hermanos mayores madrileños”, mil gracias por cuidarme, por enseñarme, por ayudarme y darme todo vuestro cariño desde que llegué por primera vez a Madrid, siempre os estaré agradecida, estoy segura de que sin vosotros, éste camino hubiera sido mucho más duro. A Rober de Flor, por esas inyecciones de autoestima y de energía que he necesitado tantas veces, por esas conversaciones noctámbulas, filosóficamente rebosantes pero también cargadas de sentimientos, gracias por dejarme y compartir conmigo ese “pensar en voz alta”, y esa “barra libre de pensamientos, sentimientos, expresiones y cualquier cosa que te surja”. A Lola, Rebe, Alber, Diego, Sonia y Mar Ares, que habéis compartido tan buenos y necesarios momentos de desconexión en la capital conmigo. Y a tí Alex, que has llegado en el último tramo del camino pero podría decir que el más duro, gracias por estar a mi lado y por ofrecerme tu ayuda siempre que la he necesitado, por comprenderme y aconsejarme, por regalarme tu atención*

*durante largas horas de lectura y correcciones. Gracias por creer en mí y hacerme sonreír siempre.*

*No quisiera dejar de mencionar, de nuevo a Lauri, y a Mary y Pablo, mis compañeros de piso durante estos años, gracias por aguantar mi carácter “berciano”. Lau, parte de ésta “carrera de fondo” también te pertenece, gracias por ofrecerme tu escucha y ánimo.*

*Gracias infinitas a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, por su apoyo incondicional desde el primer momento y a lo largo de esta gratificante, pero también dura e intensa etapa, por creer en mí, por escucharme, por ayudarme y animarme, sin ellos éste largo camino no hubiera sido posible. A mi padre, por transmitirme su gran fortaleza y voluntad, a mi madre por regalarme siempre palabras de ánimo y admiración, a Ana y a Jose, por ayudarme siempre, pero sobretodo al comienzo de ésta etapa, no hubiera sido posible sin vosotros cerca, esas idas y venidas a la estación, esos viajes Toledo-Madrid-Toledo..., hermanita gracias por enseñarme, corregirme y entenderme, a Juanjo del que admiro su sentido de la responsabilidad, por cuidarme siempre (aunque siempre serás mi hermano pequeño). A mi abuelo Juan, gracias por inculcarme desde pequeña, esa inquietud por aprender y saber, esa pasión por crecer intelectualmente marcando como claro objetivo el saber y el conocer, porque “la ignorancia es la madre del atrevimiento”. Y especialmente a mis niñas, Noa y Amaya, porque siempre me han arrancado una sonrisa en los momentos más duros y me han hecho comprender que merece la pena seguir, y que siempre hay que hacerlo sonriendo.*

*Gracias papá y mamá, por enseñarme que con esfuerzo, trabajo, voluntad y perseverancia todo llega, sin vosotros éste sueño no hubiera existido, y por eso es vuestro.*

*Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han colaborado y han hecho posible que cumpla mi objetivo, y que llegue al final del camino.*

*“Cada paso andando, es el final de una toma en el rodaje de la vida.”*









# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>23</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>31</b>
<b>ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS QUÍMICOS</b>	<b>41</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>47</b>
<b>1.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL</b>	<b>49</b>
1.1.1. La hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular	49
1.1.2. Mecanismos implicados en el desarrollo de hipertensión arterial	52
1.1.3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial	69
1.1.4. Las ratas espontáneamente hipertensas como modelo experimental de hipertensión	74
<b>1.2. COMPONENTES ALIMENTARIOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA</b>	<b>77</b>
<b>1.3. FIBRA DIETÉTICA</b>	<b>82</b>
1.3.1. Definición y clasificación	82
1.3.1.1. Fibra soluble	84
1.3.1.2. Fibra insoluble	86

<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>91</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>95</b>
<b>3.1. FIBRAS DIETÉTICAS</b>	<b>100</b>
3.1.1. Almidón hi-maize 260	100
3.1.2. Beta glucan 0,75 mm	101
3.1.3. Chitosan 95	103
3.1.4. Producto rico en fibra soluble de cacao	103
<b>3.2. ADMINISTRACIÓN AGUDA DE DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS</b>	<b>109</b>
<b>3.3. ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS</b>	<b>115</b>
<b>3.4. ENSAYOS EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS</b>	<b>119</b>
<b>3.5. ENSAYOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS PARA ESTABLECER LA IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ENDOTELIALES VASODILATADORES EN EL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO</b>	<b>124</b>
<b>3.6. TÉCNICAS UTILIZADAS</b>	<b>127</b>
3.6.1. Medida de la presión arterial	127

<b>3.6.2. Extracción de sangre</b>	<b>128</b>
<b>3.6.3. Homogeneización del tejido hepático y cuantificación de proteínas</b>	<b>129</b>
<b>3.6.4. Determinación de glucosa, colesterol total y triglicéridos en plasma</b>	<b>130</b>
<b>3.6.5. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma</b>	<b>132</b>
<b>3.6.6. Determinación de malonildialdehído en plasma y tejido hepático</b>	<b>134</b>
<b>3.6.7. Determinación de glutatión reducido en tejido hepático</b>	<b>134</b>
<b>3.6.8. Determinación de la óxido nítrico sintasa endotelial en plasma</b>	<b>135</b>
<b>3.6.9. Determinación de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma</b>	<b>136</b>
<b>3.6.10. Preparaciones de anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas en baños de órganos</b>	<b>137</b>
<b>3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>139</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>141</b>
<b>4.1. RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS TRATADAS DE FORMA AGUDA CON DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS</b>	<b>143</b>
<b>4.2. RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS TRATADAS CRONICAMENTE CON EL PRODUCTO RICO EN FIBRA</b>	<b>152</b>

**SOLUBLE DE CACAO**

<b>4.3. RESULTADOS EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS</b>	<b>182</b>
---	------------

<b>4.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS PARA ESTABLECER LA IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ENDOTELIALES VASODILATADORES EN EL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO</b>	<b>187</b>
--	------------

<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>195</b>
---------------------	------------

<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>243</b>
------------------------	------------

<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>249</b>
------------------------	------------

## **ABSTRACT**





## ABSTRACT

Food components can exhibit different biological activities and can produce beneficial effects on several physiological functions. In the last years, these bioactive components are being used to develop new functional foods. Dietary fiber has demonstrated beneficial effects on body weight, hyperlipidemia and hyperglycemia, but the effect of dietary fiber on arterial blood pressure has been less studied than the effect of dietary fiber on these other cardiovascular risk factors. However, hypertension plays a key role in cardiovascular diseases.

In this Doctoral Thesis, we have studied the effect of different fiber-rich products on the arterial blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). These animals are a well known experimental model for essential hypertension, because the development of hypertension in these rats is very similar to the development of hypertension in humans. The studied products were: starch hi-maize 260 (SHM), beta glucan 0.75 mm (BETA-G), chitosan 95 (CHIT) and a soluble cocoa fiber product (SCFP). SCFP was provided by *Natraceutical Group*, and was obtained from cocoa husk by a patented industrial process. SCFP contains soluble cocoa fiber and also polyphenols (2.24%). This is important because polyphenols have demonstrated antioxidant and antihypertensive properties. First, we investigated the short-term effects of the above mentioned products in the SHR. Different doses of these products, dissolved in 1 ml of water, were administered to the SHR by intragastric intubation, and the systolic blood pressure (SBP) was recorded by the tail cuff method in these animals, before administration, and also at different moments

## ABSTRACT

post-administration (2, 4, 6, 8, 24, 48 and 72 hours). Distilled water was used as negative control, and 50 mg/kg Captopril was used as positive control. We used 17-22 week-old male SHR, weighing 300-350 g, for these experiments. Among the studied fiber products, only SCFP decreased arterial blood pressure in the SHR, and the most effective dose of SCFP was 300 mg/kg. This dose of SCFP caused the maximum decrease in the SBP ( $-19.3 \pm 3.8$  mm Hg) 6 hours post-intragastric administration to the SHR. Surprisingly, higher doses of SCFP (400 mg/kg and 500 mg/kg) decreased less SBP in the SHR than 300 mg/kg of this fiber product. A similar paradox has been also observed by our research group with other different products that contained polyphenols. In any case, the effect of SCFP in the SHR was always less accentuated than the effect of Captopril, and SCFP did not modify SBP in the normotensive Wistar-Kyoto rats.

According to the REGULATION (EC) N° 1924/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods, it is important to demonstrate the biological properties that have been claimed for functional foods, and it is also advisable to elucidate the mechanisms that can justify these properties. Therefore, in this Doctoral Thesis, we also studied the mechanisms could be implicated in the antihypertensive effect of SCFP in SHR.

Elevated blood pressure is associated with an increased oxidative stress. The administration of 300 mg/kg SCFP increased plasma antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in the SHR. This antihypertensive dose also produced a significant decrease in plasma malondialdehyde (MDA) in

these animals. MDA reflects lipid peroxidation degree in the organism. Therefore, these data suggested that the antihypertensive effects of SCFP, in the SHR, could be related to an antioxidant mechanism.

Angiotensin converting enzyme (ACE) is a dipeptidyl carboxypeptidase that hydrolyses angiotensin I into angiotensin II, a potent vasoconstrictor peptide, and this enzyme also inactivates bradykinin, a vasodilator peptide. ACE is therefore an important drug target in the treatment of hypertension and other cardiovascular diseases. Plasma ACE activity in the 300 mg/kg SCFP treated SHR, was only slightly reduced as compared to plasma ACE activity in the SHR from the negative control group. These data suggested that the antihypertensive effects of SCFP were not related with ACE inhibition. However, as expected, plasma ACE activity was significantly lower in the 50 mg/kg Captopril treated animals, than in groups of animals mentioned before.

Hypertension is a chronic pathology that requires a chronic treatment, and for this reason we also performed a long-term study with SCFP in the SHR. In this study, 10 week-old male SHR were used, and these rats consumed the following products in the drinking fluid until the 20<sup>th</sup> week of life (treatment period): tap water (negative control), 50 mg/kg/day Captopril (positive control), different doses of SCFP (200 mg/kg/day, 400 mg/kg/day and 800 mg/kg/day) or 800 mg/kg/day BETA-G (standard fiber product). Arterial blood pressure was measured weekly in the rats by the tail cuff method. Body weight gain, solid and liquid intake were also weekly recorded in the animals. SBP was lower in the rats that had been treated with 400 mg/kg/day of SCFP or with 50 mg/kg/day

## ABSTRACT

Captopril, than in the negative control group, but the SBP in the remaining SCFP treated rats showed no differences with the SBP of the negative control rats. Glycemia, plasma total cholesterol and plasma triglycerides decreased also in the 20 week-old SHR that had been treated with 400 mg/kg/day SCFP or with 800 mg/kg/day BETA-G. Plasma ORAC values were similar in the animals that had been treated with 400 mg/kg/day SCFP than in the negative control rats. On the contrary, plasma MDA values were lower in the 400 mg/kg/day SCFP treated SHR, than in the negative control rats. These data indicated that lipid peroxidation had lessened in the 400 mg/kg/day SCFP treated SHR. They also confirmed the idea that the antioxidant properties of this fiber product could justify, at least in part, its antihypertensive effects. Plasma ACE activity in the 400 mg/kg/day SCFP treated SHR discarded the implication of this enzyme in the long-term antihypertensive effect of SCFP.

Arterial blood pressure rose gradually in the rats that had ingested 400 mg/kg/day SCFP or 50 mg/kg/day Captopril, when these treatments were removed. A total reversion of the antihypertensive effect was observed in the group of SHR that had been treated with 400 mg/kg/day SCFP, but only a partial reversion was observed in the group of SHR that had been treated with 50 mg/kg/day Captopril. After withdrawal of the 400 mg/kg/day SCFP treatment, glycemia, plasma total cholesterol, plasma triglycerides and plasma MDA also returned to control values. All these data evidenced also the bioactivity of SCFP.

In addition, the results of body weight gain, solid and liquid intake in the animals long-term administered SCFP, indicated that the nutritional value and

the sensorial properties of this fiber product would permit to include it in human foods.

In this Doctoral Thesis, we have also studied the possible involvement of the endothelial-vasorelaxing factors in the antihypertensive effects of SCFP. With this purpose, we carried out *in vitro* experiments with SCFP in different aorta ring preparations obtained from untreated SHR and also another *in vivo* experiments with SHR. SCFP did not relax the endothelium denuded aorta rings and N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) partially blocked the vascular relaxing and antihypertensive effects of SCFP. Nevertheless, Indomethacin did not modify these effects. We also carried out some trials in the aorta rings and in the SHR, to evaluate the modification of SCFP effect by Sirtinol. Sirtinol partially blocked the vascular relaxing effects of SCFP, and attenuated somewhat the antihypertensive effect of this fiber product. SCFP could decrease arterial blood pressure in SHR by increasing endothelial nitric oxide (NO) release in these animals. SCFP may promote the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mediated by sirtuin-1 (SIRT-1). The eNOS activity data in the long-term 400 mg/kg/day SCFP treated SHR, confirms this idea, but SCFP may also improve the bioavailability of NO, as this fiber product has antioxidant properties and could eliminate the oxygen radical species that destroy this mediator.

We believe that polyphenols could be responsible for the vasodilator and antihypertensive effects of SCFP in SHR, but further investigation should be carried out to clarify the molecular pathways involved in the beneficial effects of

## ABSTRACT

SCFP to control arterial blood pressure. It seems clear that future studies should provide more information in order to use this fiber product as an antihypertensive food ingredient. It is also true that further investigation should be carried out to demonstrate its antihypertensive efficiency in humans, but the present Doctoral Thesis represents a valuable contribution to clarify the mechanisms implicated in the antihypertensive effect of SCFP.

# RESUMEN





## RESUMEN

Los componentes de los alimentos pueden ejercer distintas actividades biológicas y pueden producir en el organismo un efecto beneficioso sobre una o varias funciones fisiológicas. En los últimos años, estos componentes alimentarios con actividad biológica, se están utilizando para desarrollar nuevos alimentos denominados alimentos funcionales. La fibra dietética se sabe que puede ejercer efectos beneficiosos sobre el peso corporal, la hiperlipidemia y la hiperglucemia, pero sus efectos sobre la presión arterial se han estudiado mucho menos que sus efectos sobre estos otros factores de riesgo cardiovascular. La hipertensión es sin embargo una patología clave en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

En la presente Tesis Doctoral, hemos estudiado el posible efecto antihipertensivo de distintos compuestos ricos en fibra, sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Estos animales son un modelo experimental de hipertensión muy utilizado, ya que el desarrollo de hipertensión en ellos presenta muchas similitudes con el desarrollo de la hipertensión esencial en humanos. Los productos estudiados fueron los siguientes: almidón hi-maize 260 (AHM), beta glucan 0,75 mm (BETA-G), chitosan 95 (CHIT) y un producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC). Este último producto lo proporcionó la empresa *Natraceutical Group*, y se obtiene a partir de la cascarilla del grano del cacao mediante un proceso patentado por esta empresa. PFSC es rico en fibra soluble de cacao y tiene además un 2,24% de polifenoles. Esto le diferencia de los restantes productos ricos en fibra

## RESUMEN

seleccionados para estudiar en esta Tesis Doctoral, pues los polifenoles se sabe que tienen propiedades antioxidantes y antihipertensivas. Nuestro primer objetivo fue estudiar en las ratas SHR el efecto agudo de todos los productos mencionados. Para ello, administramos, por vía intragástrica, a estos animales, distintas dosis de estos productos disueltas en 1 ml de agua, y se evaluó la modificación de la presión arterial sistólica (PAS) que producían. Para estos ensayos, se utilizaron ratas SHR macho de 17-22 semanas de vida, y peso comprendido entre 300 y 350 g. Se utilizó agua como control negativo, y 50 mg/kg de Captopril como control positivo. La PAS se medía antes de la administración y en distintos momentos después de la misma (2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después). Para la medida, se utilizó la técnica del manguito en la cola. De todos los productos administrados por vía intragástrica, sólo PFSC fue capaz de disminuir la PAS de las ratas SHR, pero el efecto antihipertensivo de PFSC fue siempre menor que el efecto antihipertensivo producido por Captopril. La dosis más eficaz de PFSC fue la dosis de 300 mg/kg que, seis horas después de su administración, ocasionó una disminución máxima de la PAS en las ratas SHR de  $-19,9 \pm 4,0$  mm Hg. Sorprendentemente, el incremento de la dosis de PFSC, no se acompañó siempre de un aumento en el efecto antihipertensivo de este producto. No obstante, nuestro grupo de investigación ha observado una paradoja semejante estudiando en ratas SHR otros productos que contienen polifenoles. Por otra parte, la administración de 300 mg/kg de PFSC no modificó la PAS de las ratas Wistar-Kyoto, que son el control normotenso de las ratas SHR.

El reglamento relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (REGLAMENTO (CE) N° 1924/2006 DEL PARLAMENTO Y DEL CONSEJO EUROPEO), establece que es necesario demostrar las propiedades funcionales alegadas, pero también sugiere que se estudien los mecanismos de acción implicados en los efectos demostrados. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral, también intentamos dilucidar el mecanismo, o los mecanismos, implicados en el efecto antihipertensivo de PFSC en las ratas SHR.

La hipertensión se asocia con un incremento del estrés oxidativo. La administración por vía intragástrica de 300 mg/kg de PFSC, ocasionó un aumento de la capacidad antioxidante (Oxygen radical absorbance capacity= Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno=ORAC) del plasma de las ratas SHR, y también ocasionó una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de malonildialdehído (MDA) en estos animales. El MDA es un metabolito que refleja el grado de peroxidación lipídica, ya que se forma cuando los radicales libres atacan las cadenas laterales de los ácidos grasos y las lipoproteínas del plasma. Estos datos sugirieron que los efectos antihipertensivos de PFSC en las ratas SHR podían estar relacionados con un mecanismo antioxidante.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) hidroliza la angiotensina I y la convierte en angiotensina II, que es un péptido vasoconstrictor, e inactiva además la bradiquinina, que es un péptido vasodilatador. Por este motivo, la ECA es una diana importante en el tratamiento de la hipertensión arterial y

otras patologías cardiovasculares. La actividad de la ECA en las muestras de plasma de las ratas SHR tratadas por vía intragástrica con 300 mg/kg de PFSC, fue sólo algo menor que la actividad de esta enzima en las muestras de plasma de los animales del grupo control negativo. Estos datos indicaron que los efectos antihipertensivos de PFSC no estaban relacionados con la inhibición de la ECA. Como era de esperar, la actividad de la ECA en las muestras de plasma de las ratas SHR que se habían tratado por vía intragástrica con 50 mg/kg de Captopril, fue menor que la actividad de esta enzima en las muestras de plasma de los grupos de ratas antes mencionados.

La hipertensión es una patología crónica, que requiere tratamiento continuado. Por eso, en esta Tesis Doctoral, nos pareció que resultaba inevitable realizar un estudio en el que se administraba PFSC a las ratas SHR durante un periodo prolongado de tiempo. Para este estudio, se utilizaron ratas SHR macho, con 10 semanas de vida, que ingirieron respectivamente los siguientes productos, en el biberón, hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento): agua (control negativo), 50 mg/kg/día de Captopril (control positivo), distintas dosis de PFSC (200 mg/kg/día, 400 mg/kg/día y 800 mg/kg/día) o 800 mg/kg/día de BETA-G (fibra estándar). Desde el comienzo del estudio, se controló semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de estos animales, y se llevaron a cabo también semanalmente, medidas de la PAS en los seis grupos de ratas, a partir de las 11 semanas de vida, hasta que finalizó el estudio. Para estas medidas, se utilizó también la técnica del manguito en la cola. A lo largo del periodo de tratamiento, los valores de la PAS fueron siempre menores en el grupo de animales que ingería

diariamente 400 mg/kg de PFSC, que en el grupo que ingería agua, pero la administración continuada de 50 mg/kg de Captopril ocasionó un descenso de la PAS aún mayor que el producido por 400 mg/kg de PFSC. Los restantes grupos no mostraron diferencias con el control negativo. Se observó una disminución de la glucosa, el colesterol total y los triglicéridos en el plasma de las ratas SHR de 20 semanas de vida que se habían tratado con 400 mg/kg de PFSC o con 800 mg/kg/día de BETA-G. La capacidad antioxidante del plasma (ORAC) de los animales tratados diariamente con 400 mg/kg de PFSC, no se modificó, pero la concentración de MDA en el plasma de las ratas SHR tratadas con 400 mg/kg/día de PFSC, fue más baja que la concentración de este metabolito en el plasma de los animales que ingerían agua. Así pues, los valores plasmáticos de MDA de las ratas tratadas de forma crónica con PFSC, indicaron que estos animales presentaban una disminución en los niveles de peroxidación lipídica. Estos resultados también sugieren que un mecanismo antioxidante puede estar implicado, al menos en parte, en las propiedades antihipertensivas de este compuesto. Por otra parte, los resultados del estudio de administración crónica, corroboraron que los efectos antihipertensivos de PFSC, en las ratas SHR, no estaban relacionados con la inhibición de la ECA en estos animales.

La retirada de los tratamientos antihipertensivos, que se habían administrado de forma continuada a las ratas SHR, ocasionó una reversión de su efecto. La reversión fue total cuando se retiró el tratamiento con 400 mg/kg/día de PFSC, pero fue parcial cuando se retiró el tratamiento con 50 mg/kg/día de Captopril. Los efectos de PFSC sobre la glucemia, el perfil lipídico

y los niveles plasmáticos de MDA también revirtieron al retirar el tratamiento con 400 mg/kg/día de PFSC. Todos los resultados obtenidos después de retirar la administración de PFSC, constituyen también una prueba de la bioactividad de este producto.

Por otra parte, los datos del peso corporal y de la ingesta sólida y líquida de las ratas SHR tratadas de forma continuada con PFSC, indicaron que este producto tenía unas características nutricionales y organolépticas adecuadas, para su posible inclusión en un alimento de consumo humano.

En esta Tesis Doctoral llevamos a cabo también algunos ensayos adicionales que nos permitieron estudiar la implicación de los factores vasodilatadores endoteliales en los efectos antihipertensivos de PFSC. Concretamente, se estudió el efecto de PFSC en preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR con el endotelio intacto, y en preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR sin endotelio. También se estudiaron los efectos de este producto en preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR con el endotelio intacto que se incubaban alternativamente con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), Indometacina o Sirtinol. Todas estas preparaciones se montaban en baños de órganos por el método tradicional. Se evaluó asimismo la modificación de la PAS producida por la administración aguda de PFSC en ratas SHR que recibían también alternativamente tratamiento intraperitoneal con L-NAME, Indometacina o Sirtinol. Los ensayos con preparaciones de anillos de aorta demostraron que PFSC tenía un efecto relajante vascular endotelio dependiente, y que este efecto estaba mediado, al menos en parte,

por la liberación de óxido nítrico (NO). Asimismo, estos ensayos sugirieron que PFSC promovía la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mediada por sirtuina-1 (SIRT-1). Los resultados obtenidos en los ensayos que se realizaron en las ratas SHR con L-NAME, Indometacina o Sirtinol, corroboran estas ideas. Sin embargo, también es necesario tener en cuenta que habíamos observado un incremento de la actividad de la eNOS en el plasma de las ratas SHR que se habían tratado de forma continuada con 400 mg/kg/día de este producto. Ello nos lleva a concluir que los efectos vasodilatadores y antihipertensivos de PFSC, están relacionados con una activación de la eNOS. Posiblemente, este producto promueve la activación de esta enzima por SIRT-1, y ocasiona la consiguiente liberación de NO, pero además, por sus propiedades antioxidantes, PFSC podría eliminar las especies reactivas de oxígeno que degradan este mediador, mejorando así su biodisponibilidad.

En último término, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que PFSC presenta propiedades antioxidantes y antihipertensivas, probablemente debidas a su contenido en polifenoles, y que este producto podría incluirse como ingrediente en un alimento funcional útil para la prevención y/o el control de la presión arterial. Antes de la utilización comercial de éste producto como ingrediente de un alimento funcional, serán necesarios, sin embargo, estudios que demuestren la seguridad de PFSC en la población general y su eficacia en pacientes hipertensos.





# **ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS QUÍMICOS**



**ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS QUÍMICOS**

4-AF	4-aminofenazona
AA	Ácido araquidónico
ABS	Absorbancia
ADN	Ácido dexosirribonucleico
ADP	Adenosina-5-difosfato
AHM	Almidón hi-maize 260
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
AR	Almidón resistente
ARAI	Antagonista de los receptores de angiotensina II
ATGL	Lipasa de triglicéridos adiposos
ATP	Adenosín trifosfato
BETA-G	Beta glucan 0,75 mm
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
CaCl	Cloruro de calcio
COX	Ciclooxigenasa
CHE	Colesterol esterasa
CHIT	Chitosan
CHOD	Colesterol oxidasa
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

## ABREVIATURAS

ESM	Error estándar de la media
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Agencia de Alimentos y Fármacos
Fe <sup>2+</sup>	Ión ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Ión férrico
FMN	Flavin mononucleótido
FoxO	Factores de transcripción "forkhead"
GK	Glicerol quinasa
G3P	Glicerol-3-fosfato
GPO	Glicerolfosfato deshidrogenasa
GOD	Glucosa oxidasa
GP <sub>x</sub>	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HCIO	Ácido hipocloroso
HDAC	Histona desacetilasa
HOONO	Radical dióxido de nitrógeno
H-ORAC	ORAC Hidrofílico
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
ILSI	Instituto Internacional de Ciencias Biológicas (International Life Sciences Institute)
ISH	Sociedad Internacional de Hipertensión
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPL	Lipoproteinlipasa
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metil-éster

L-ORAC	ORAC Lipofílico
LXR	Receptor X del hígado
MDA	Malonildialdehído
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
MPO	Mieloperoxidasa
NO	Óxido de nítrico
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaCl	Cloruro sódico
NaHCO <sub>2</sub>	Bicarbonato de sodio
NF-kB	Factor nuclear-kB
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS	Óxido nítrico sintasa
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno (Oxygen radical absorbance capacity)
OPA	o-ftaldialdehído
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PFSC	Producto rico en fibra soluble de cacao
PGC-1 <sub>α</sub>	Coactivador transcripcional -1alfa
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
POD	Peroxidasa

## ABREVIATURAS

PPAR <sub>α</sub>	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo alfa
p53	Proteína supresora de tumores p53
ROOH	Radical hidroperóxido
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SEC	Sociedad Europea de Cardiología
SEH	Sociedad Europea de Hipertensión
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SIRT	Sirtuina
SOD	Superóxido dismutasa
SP-SHR	Ratas espontáneamente hipertensas propensas a desarrollar infarto cerebral
PBS	Solución de tampón fosfato
TAX <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TE	Equivalentes de Trolox
UCP-2	Proteína desacoplante 2 mitocondrial
WKY	Ratas Wistar-Kyoto

# **INTRODUCCIÓN**





## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

#### **1.1.1. La hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular**

La presión arterial se define como la fuerza que ejerce la sangre que bombea el corazón sobre cualquier área de la pared arterial. La hipertensión arterial es, por tanto, el aumento de la presión arterial por encima de los valores normales, tanto de la presión arterial sistólica (PAS) como de la presión arterial diastólica (PAD). La Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) publicó en la Guía Europea SEH/SEC de 2007 una clasificación de la hipertensión en función de los valores de la PAS y la PAD medidas en mm Hg. Esta clasificación se describe a continuación (tabla 1, página 50).

La hipertensión arterial es un problema muy importante a nivel de salud pública. Hay que tener en cuenta que esta enfermedad es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular, y que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en nuestro país. En España, la incidencia de hipertensión en la población adulta es del 35%, y esta cifra aumenta hasta el 40% en edades medias y hasta el 68% en adultos mayores de 65 años (Banegas et al., 2005). Además, aunque la detección, control y tratamiento de la hipertensión arterial son fáciles, se estima que solo entre un

## INTRODUCCIÓN

5% y un 10% de los pacientes hipertensos recibe un tratamiento adecuado (Wolf-Maier et al., 2004).

**Tabla 1.** Clasificación de la hipertensión arterial según la guía europea SEH/SEC de 2007.

CLASIFICACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL		PAS	PAD
<b>NORMOTENSIÓN</b>	ÓPTIMA NORMAL NORMAL ALTA	< 120 120-129 130-139	< 80 80-84 85-89
<b>HIPERTENSIÓN</b>	GRADO 1 (media) GRADO 2 (moderada) GRADO 3 (severa) SISTÓLICA AISLADA*	140-159 160-179 180-209 ≥ 140	90-99 100-109 110-119 < 90

\* La hipertensión sistólica aislada debe clasificarse en grados (1,2,3) según las cifras de presión arterial sistólica en los rangos indicados, siempre que las cifras de la presión diastólica sean < 90 mm Hg.

PAS=Presión arterial sistólica; PAD=Presión arterial diastólica; SEH=Sociedad Europea de Hipertensión; SEC=Sociedad Europea de Cardiología.

Según la tabla anterior, cifras de 140 mm Hg para la PAS y de 90 mm Hg para la PAD se consideran el límite que define la hipertensión. Es importante además señalar, que en pacientes con diabetes, enfermedad renal crónica o enfermedad cardiovascular, los parámetros de la PAS y de la PAD deberán ser más estrictos para definir la hipertensión (PAS=130 mm Hg y PAD=80 mm Hg).

La presión arterial sufre variaciones espontáneas a lo largo del día y

entre distintos días, meses y estaciones. También influye en el valor de la presión la temperatura ambiental, el estado físico y el estado emocional del paciente. Debido a ésta variabilidad la medida de la presión arterial es poco reproducible, aunque la técnica de la medida es relativamente fácil. Las medidas se obtienen usualmente mediante el uso de un esfigmomanómetro de mercurio.

La hipertensión arterial puede clasificarse según su etiología en hipertensión primaria o esencial e hipertensión arterial secundaria.

- La hipertensión arterial esencial tiene origen desconocido. Es la que tiene mayor incidencia en la población y la padecen alrededor del 95% de los pacientes hipertensos. Existen diferentes aspectos fisiopatológicos que la caracterizan, como son la disfunción endotelial (Swales, 1995) y el remodelado de la pared de las arterias de resistencia (Folkow, 1990; Mulvany, 1994). La hipertensión esencial se desarrolla como resultado de complejas interacciones entre diferentes genes susceptibles, algunos desconocidos hasta ahora, y factores ambientales concretos. Ambos factores, genéticos y ambientales, influyen sobre diferentes mecanismos celulares encargados de la regulación de la presión arterial. Se conocen, diferentes causas fácilmente controlables que afectan al desarrollo de esta enfermedad. Entre ellas, la dieta con alto contenido en sodio, el tabaquismo, el consumo de alcohol, el sedentarismo y el estrés ambiental. Algunas causas no controlables son la genética, la raza, el género o la edad.

- La hipertensión secundaria, se debe sin embargo, a alguna causa conocida, como puede ser la existencia de enfermedades renales, el estrechamiento de la aorta o irregularidades hormonales. Cabe señalar, que éste tipo de hipertensión la padecen un escaso número de pacientes hipertensos, entre un 5% y un 10%.

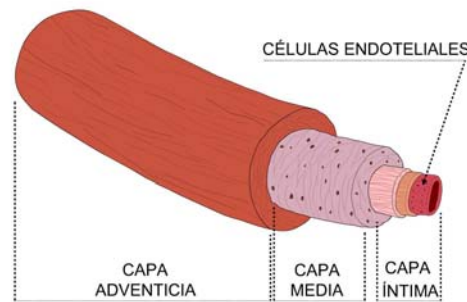
Es importante señalar la necesidad de tener en cuenta el riesgo cardiovascular total global, a la hora de diagnosticar y tratar la hipertensión arterial (SEH/SEC, 2007), ya que la mayoría de los pacientes hipertensos no solo poseen una elevación de la presión arterial, sino que también presentan otras patologías, como pueden ser las dislipidemias, la obesidad o la diabetes.

### **1.1.2. Mecanismos implicados en el desarrollo de hipertensión arterial**

Existen distintos receptores en el músculo liso que facilitan la relajación y la contracción de este tejido y que, por lo tanto, controlan el tono vascular y la presión arterial. El endotelio es un tejido que tiene gran importancia en la regulación del tono vascular ya que en él se sintetizan distintos factores vasoactivos. Es importante también el control que ejerce el sistema renina-angiotensina sobre el tono arterial, así como la regulación de la homeostasis vascular a través del estado redox del organismo. A continuación, comentaremos cada uno de estos mecanismos implicados en la regulación de la presión arterial.

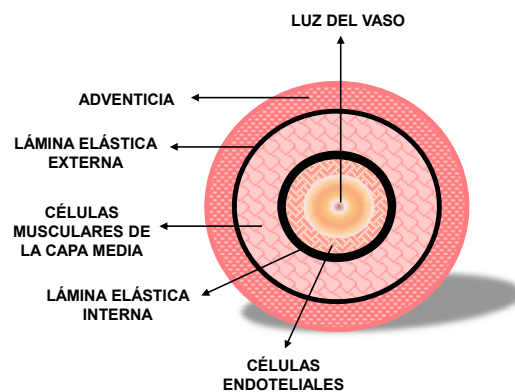
### ***El músculo liso vascular y el endotelio***

La pared de las arterias está constituida por tres capas perfectamente diferenciadas morfológicamente: íntima (o endotelio), media y adventicia (ver figura 1).



**Figura 1.** Representación de las tres capas que constituyen la pared arterial.

El endotelio y la capa media están separadas por la lámina elástica interna y, a su vez, la capa media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa (Rhodin, 1978) (ver figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura de la pared arterial.

La capa media está formada principalmente por músculo liso, y actúa como sistema efector de la contracción y la relajación vascular. Existen diferentes hormonas y mediadores químicos capaces de estimular la contracción de la musculatura lisa. Las sustancias efectoras más importantes

y relevantes para la contracción del músculo liso vascular son la noradrenalina, la angiotensina II y la endotelina-1. Recientemente se ha postulado que la adventicia, tradicionalmente considerada una estructura de soporte, tiene también un papel importante en la regulación de la función y de la estructura vascular (McGrath et al., 2005; Somoza et al., 2005; Haurani & Pagano, 2007; Cabrera, 2008; Galán et al., 2011), pero todavía no se conocen muchos detalles sobre la influencia de este tejido en el tono arterial.

El endotelio es el tejido que separa la pared vascular de la sangre circulante. Esta estructura celular sirve de barrera, evitando el paso de agentes nocivos al interior de la pared vascular. El endotelio constituye además un elemento clave en la homeostasis cardiovascular, ya que es capaz de detectar cambios mecánicos, hormonales y químicos, que promueven la producción y liberación de diversas sustancias, para ajustar el tono vascular o modificar la estructura de los vasos. El endotelio cumple también una función antitrombótica, ya que inhibe la adhesión de las células sanguíneas a la pared arterial. Las investigaciones de Furchgott, en 1980, cambiaron muchas de las ideas sobre funcionalidad vascular, vigentes hasta entonces. Furchgott y Zawadki demostraron que la relajación vascular inducida por acetilcolina era dependiente de la presencia de endotelio (Furchgott & Zawadki, 1980). Esta relajación se debía a un factor relajante derivado de endotelio, que se identificó posteriormente como óxido nítrico (NO) (Furchgott, 1999). Moncada y Vane, en 1984, habían observado además que el endotelio era capaz de liberar prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). La PGI<sub>2</sub> fue en realidad el primer factor relajante vascular derivado del endotelio que se caracterizó (Moncada & Vane, 1984). Todas

estas investigaciones permitieron establecer que el endotelio no era simplemente una barrera física que separaba la pared vascular de la sangre circulante. Este tejido participa de forma muy importante en la modulación del tono vascular, y hoy día se ha reconocido su papel como órgano de regulación autocrina, paracrina y endocrina. El tono vascular, definido como el grado de contracción del músculo liso de la pared vascular en situación basal, es el resultado de la interacción de diversos factores, tanto vasodilatadores como vasoconstrictores. En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre los factores endoteliales que promueven la relajación vascular, y los factores endoteliales vasoconstrictores, y este equilibrio contribuye a mantener el tono vascular normal (Wahl & Schilling, 1993). Entre los factores endoteliales vasodilatadores, figuran la  $\text{PGI}_2$  y el NO, ya mencionados con anterioridad, y también un factor denominado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), de naturaleza desconocida. Entre los factores endoteliales vasoconstrictores, figuran distintos endoperóxidos, el tromboxano  $\text{A}_2$ , ( $\text{TXA}_2$ ) y la endotelina. El anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que se libera en el endotelio, puede considerarse también un factor más que promueve la contracción vascular. El endotelio puede perder su funcionalidad en situaciones patológicas, tales como hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes *mellitus*. En todas estas situaciones, se produce un daño en el endotelio que conlleva la liberación de factores quimiotácticos, así como la expresión de moléculas que facilitan la adhesión de leucocitos, plaquetas, etc., contribuyendo todo ello al daño vascular (Haller, 1997). La disfunción endotelial se ha definido como la pérdida de la capacidad vasodilatadora del endotelio, principalmente como consecuencia de una disminución en la biodisponibilidad de NO (Pepine, 1998;



Granger & Alexander, 2000).

El NO es un potente agente vasodilatador que se produce y libera en el endotelio, tanto en condiciones basales, como tras la unión de diversas sustancias vasoactivas a sus receptores específicos localizados en la membrana de la célula endotelial (Wahl & Schilling, 1993). El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Myers et al., 1990; Moncada et al., 1991). La NOS es una hemoproteína que transforma la L-arginina en L-citrulina, liberando a su vez NO. Esta enzima, además del sustrato, requiere oxígeno (Jun et al., 1996) y la presencia de calmodulina y cuatro cofactores: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Ito et al., 1995; Du et al., 1995), flavín adenín dinucleótido (FAD) (Liang et al., 1996), flavín mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Pandey et al., 1996). Se han identificado tres isoenzimas diferentes de la NOS (Moncada et al., 1997). Dos de ellas son constitutivas: la NOS neuronal (nNOS), identificada en tejido neuronal y también conocida como NOS tipo I (Laursen et al., 1997), y la NOS endotelial (eNOS), identificada en células endoteliales vasculares y también conocida como NOS tipo III (Cardillo et al., 1997). La tercera isoforma es la NOS inducible (iNOS), también llamada NOS tipo II. Esta isoforma de la NOS se induce por citoquinas en macrófagos y hepatocitos, y también está presente en el músculo liso (Katušić & Cosentino, 1994; Knowles & Moncada, 1994; Maenishi et al., 1997). El NO producido por las isoenzimas constitutivas de la NOS, influye en el tono vascular basal y media la respuesta vascular a diferentes estímulos en condiciones normales. Por su parte, la iNOS sería la "forma fisiopatológica" de la NOS, y el NO producido por esta isoenzima sería

un importante mediador en situaciones inflamatorias (Faraci & Brian, 1994). Las tres isoformas de la NOS se inhiben de manera competitiva por análogos de la L-arginina, como la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) (Moncada et al., 1991).

La PGI<sub>2</sub> es un metabolito del ácido araquidónico que, como hemos comentado, tiene también efectos vasodilatadores y relajantes en el músculo liso vascular. En el endotelio, la síntesis de PGI<sub>2</sub> se produce a partir de endoperóxidos de prostaglandinas, que se transfieren directamente desde las plaquetas, o a partir del ácido araquidónico (AA), que se libera de los fosfolípidos de la membrana. La movilización del AA está catalizada por la acción conjunta de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (enzima Ca<sup>2+</sup> - dependiente), la fosfolipasa C y la fosfoglicérido lipasa. Una vez liberado el AA, éste se transforma en prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), por acción de la ciclooxygenasa (COX). Después, se reduce el grupo hidropéroxido de la PGG<sub>2</sub>, y se forma un hidróxido por acción de la prostaglandina endoperóxido sintasa, liberándose radicales de oxígeno y prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Por último, se produce la isomerización de la PGH<sub>2</sub> a PGI<sub>2</sub>. Algunos de los factores que favorecen la síntesis de PGI<sub>2</sub> son la  $\alpha$ -trombina (Weksler et al., 1978, Czervionke et al., 1979; Hong, 1980), los esteres de colina, la histamina (Baenziger et al., 1980; Alhenc-Gelas et al., 1982) y la bradikina (Hong, 1980). Por el contrario, la formación de PGI<sub>2</sub> se inhibe con glucocorticoides, inhibidores de la COX, lipoproteínas de baja densidad y vitamina K (Vane et al., 1987). La PGI<sub>2</sub> es capaz de ejercer una acción relajante sobre el musculo liso vascular en concentraciones bajas, pero, a concentraciones altas, la PGI<sub>2</sub> posee efecto vasoconstrictor. La relajación a bajas concentraciones, que es su efecto más conocido, se debe a la

hiperpolarización de la membrana, y esta hiperpolarización se produce por acción del adenosín monofosfato cíclico, que activa los canales de  $K^+$ - $Ca^{2+}$  - dependientes (Shadoshima et al., 1988; Fukumitsu et al., 1990)

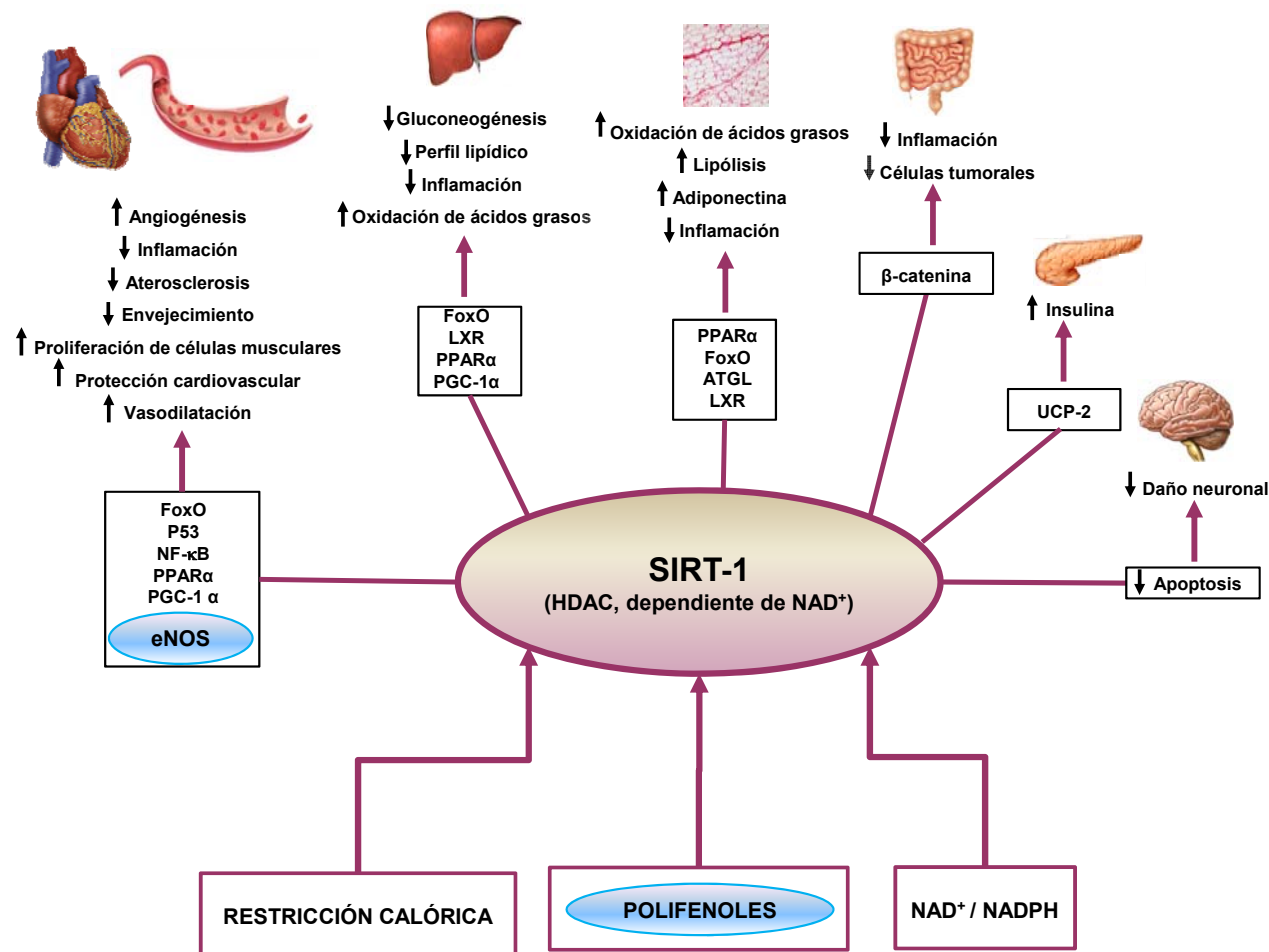
### ***Sirtuinas***

Las sirtuinas (SIRT) son desacetilasas de histonas (HDAC) de clase III (HDAC III). Estas enzimas catalizan la desacetilación de proteínas que contienen lisinas  $\epsilon$ -amino-acetiladas y, para ello, utilizan como co-sustrato la nicotinamida adenina dinucleótido oxidada ( $NAD^+$ ). Esto las diferencia de las HDAC de clase I, II y IV, que cuentan con un mecanismo catalítico dependiente de  $Zn^{2+}$  e independiente de  $NAD^+$  (Peserico & Simone, 2011). Se ha demostrado que las SIRT participan en varios procesos fisiológicos, como el control del ciclo celular, la resistencia al estrés, la apoptosis, la diferenciación celular y el metabolismo energético, entre otros (Caito, 2010; Zee, 2010). Estas proteínas se han relacionado concretamente con el aumento en la esperanza de vida asociado a la restricción calórica (Cohen, 2004) y, más recientemente, también con el retraso en el envejecimiento vascular (Menghini et al., 2007; Ota et al., 2009). En los mamíferos, existen siete isotipos de SIRT (Blagosklonny, 2007; Westphal et al., 2007; Pallás et al., 2008). Todas las isoformas presentan un núcleo catalítico conservado, denominado dominio SIRT, que tiene entre 240 y 276 aminoácidos, y regiones N-C-terminales muy variables en longitud y en secuencias aminoacídicas (Frye, 2000). De los siete isotipos de SIRT encontrados en mamíferos, la SIRT tipo 1 (SIRT-1) es la proteína más estudiada de la familia. Se ha demostrado que SIRT-1 es una enzima redox-

sensible (Caito, 2010; Zee, 2010), y se sabe que SIRT-1 está implicada en la reducción del estrés oxidativo asociado con estados de inflamación. Su efecto antiinflamatorio está mediado por la desacetilación de factores de transcripción, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, conocido como factor nuclear-kB (NF-kB) (Yeung et al., 2004), el factor p53 (Vaziri et al., 2001; Luo et al., 2001), o factores de transcripción “forkhead” (FoxO) (Chua et al., 2005; Potente et al., 2007; Yuan et al., 2009). La desacetilación de estos factores induce la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) o catalasa (Caito et al., 2010; Zee et al., 2010). La SIRT-1 es capaz de regular también la función endotelial a través de la desacetilación de la eNOS, aumentando la actividad y/o expresión de esta enzima (Potente & Dimmeler, 2008). Por lo tanto, la SIRT-1 es capaz de promover un aumento de la cantidad de NO y de la biodisponibilidad de este mediador en el lecho vascular. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de SIRT-1 en el endotelio de las arterias inhibe la vasodilatación dependiente de endotelio y disminuye la biodisponibilidad de NO (Nisoli et al., 2005; Mattagajasingh et al., 2007). El resveratrol, que es un polifenol vegetal que estimula la actividad de SIRT-1 (Howitz et al., 2003), activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y mejora la función endotelial. Además, impide la elevación de la presión sanguínea y restaura la actividad de la eNOS vascular en modelos animales de disfunción endotelial (Wallerath et al., 2002; Miatello et al., 2005). En realidad, el resveratrol y otros polifenoles como la curcumina, la quercetina y las catequinas, presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y todos ellos se ha descrito que activan de manera directa o indirecta la SIRT-1 (Huige & Ulrich, 2009; Joanne et al, 2009).

## INTRODUCCIÓN

SIRT-1 es actualmente una diana importante en el tratamiento de algunas enfermedades metabólicas, inflamatorias y neurodegenerativas (Chua et al., 2005; Moynihan et al., 2005; Mattagajasingh et al., 2007; Yamamoto et al., 2007; Firestein et al., 2008; Lavu et al., 2008; Rodgers et al., 2008; Yuan et al., 2009; Wan et al., 2012; Zarzuelo et al., 2013). La figura 3 muestra un esquema de los procesos metabólicos y fisiológicos que regula la SIRT-1 (ver figura 3).



**Figura 3.** Efectos metabólicos y fisiológicos regulados por la activación de la sirtuina-1 (SIRT-1). ATGL=Lipasa de triglicéridos adiposos; eNOS=Óxido nítrico sintasa endotelial; FoxO=Factores de transcripción "forkhead"; HDAC=Histona desacetilasa; LXR=Receptor X del hígado;  $NAD^+$ =Nicotinamida adenina dinucleótido;  $NADPH$ =Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NF- $\kappa$ B=Factor nuclear- $\kappa$ B; p53=Proteína supresora de tumores p53; PGC-1 $\alpha$ =Coactivador transcripcional-1alfa; PPAR $\alpha$ =Receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo alfa; UCP-2=Proteína desacoplante 2 mitocondrial.

### ***Sistema Renina-Angiotensina***

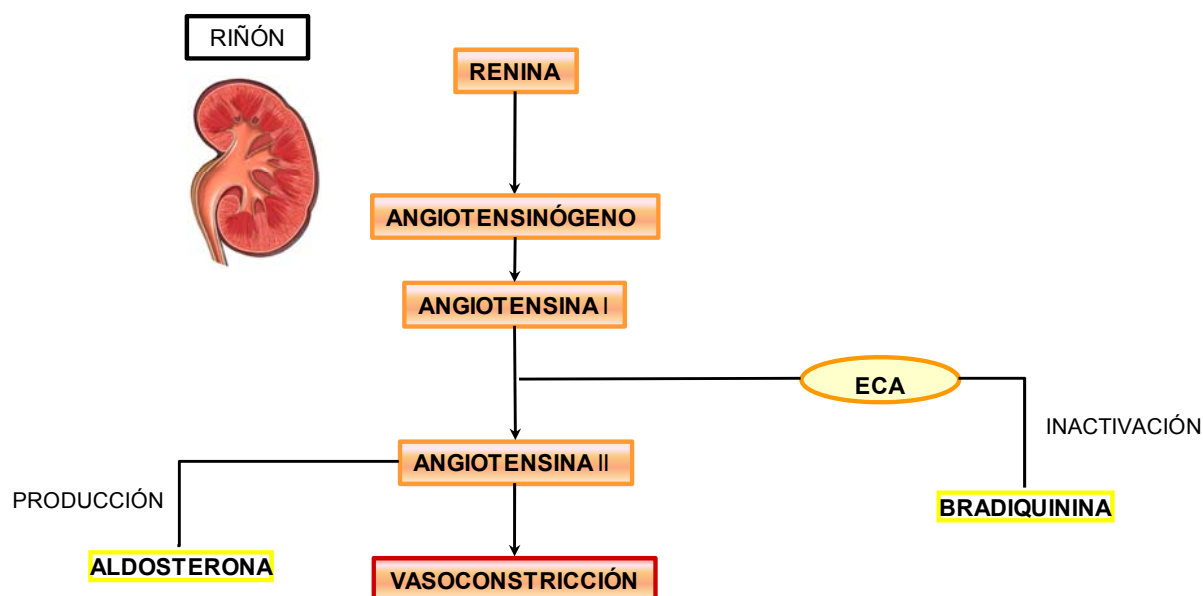
El sistema renina-angiotensina está directamente implicado en el control de la presión arterial y del equilibrio electrolítico, a través de diferentes mecanismos que dependen de la producción de angiotensina II y de aldosterona. La actividad de este sistema, tanto del conjunto de péptidos como de las enzimas que lo constituyen, es fundamental para la regulación del tono arterial. El aparato yuxtaglomerular del riñón responde a la disminución de presión arterial sintetizando y almacenando una glucoproteína de 350 aminoácidos, denominada renina, que se libera al torrente sanguíneo. La renina actúa sobre el angiotensinógeno, único sustrato de la renina, produciendo angiotensina I. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una glicoproteína plasmática que cataliza la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido con alta eficiencia vasoconstrictora. Ésta angiotensina II es el principal estímulo para la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, y la aldosterona produce la reabsorción de agua y sodio por los túbulos renales. Ello ocasiona una elevación del volumen intravascular, de manera que se produce un aumento de la presión arterial. Como consecuencia de ello, se pone en funcionamiento un sistema de retroalimentación negativa que provoca una disminución en la liberación de la renina. Cuando el sistema de retroalimentación negativa deja de funcionar, se produce hipertensión arterial, ya que se produce excesiva producción de angiotensina II que favorece la vasoconstricción, la secreción de la aldosterona y la retención de agua y de sodio.

Las quininas son péptidos que se forman a partir de sustratos denominados quininógenos, que están presentes en el plasma, la linfa y el fluido intersticial de los mamíferos. Las quininas más conocidas son la Lys-bradiquinina y la bradiquinina; éste último péptido es un potente vasodilatador. La inactivación de estas quininas se realiza a través de enzimas proteolíticas que actúan a nivel del grupo C-terminal de estos péptidos. Estas enzimas, son la quininasa I y la quininasa II, que proporcionan metabolitos biológicamente inactivos. La ECA pertenece a este último grupo de enzimas. Es una quininasa II que se encarga, por lo tanto, de sintetizar angiotensina II y de hidrolizar e inactivar la bradiquinina y otros potentes péptidos vasodilatadores, favoreciendo la vasoconstricción.

La inhibición de la ECA impide la transformación de la angiotensina I en angiotensina II, bloqueando así la cascada de reacciones propia del sistema renina-angiotensina. Esta inhibición tiene como consecuencia la supresión en la formación de compuestos vasoconstrictores, tales como la angiotensina II, y también la inhibición de la degradación de sustancias vasodilatadoras, entre ellas la bradiquinina. Sin embargo, cuando se produce la inhibición de la ECA, no se bloquea totalmente la producción de angiotensina II. Esto se debe en parte a la transformación de la angiotensina I en angiotensina II por acción de determinadas enzimas denominadas quimasas (Husain, 1993). El Captopril, es un octapéptido inhibidor específico de la ECA que encabeza un grupo de fármacos conocidos como inhibidores de la ECA (IECA), que tienen gran utilidad terapéutica.



A continuación se muestra un esquema del sistema renina-angiotensina (ver figura 4).



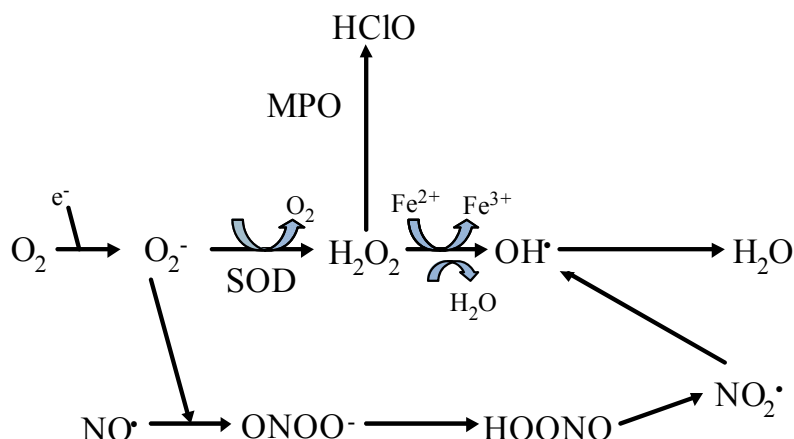
**Figura 4.** Sistema renina-angiotensina. ECA=enzima convertidora de angiotensina.

### ***Estrés oxidativo e hipertensión arterial***

Existen evidencias científicas que demuestran la relación que existe entre la aparición de hipertensión arterial y el estrés oxidativo (Schulz et al., 2008; Touyz & Schiffrin, 2008). Las especies reactivas del oxígeno (ROS), se generan principalmente en la mitocondria como consecuencia del metabolismo celular; y algunos defectos en la estructura y en la función de la mitocondria, que suceden fundamentalmente por anomalías genéticas, se asocian a enfermedades cardiovasculares (Marín-García & Goldenthal, 2002). Las ROS también se pueden producir específicamente por fagocitos y otros tipos celulares, como respuesta a distintos agentes externos. Entre ellos, agentes ambientales, la luz ultravioleta, agentes farmacológicos, agentes nutricionales o

fuentes contaminantes presentes en los alimentos como son los aditivos, y otros agentes externos como el tabaco.

Las distintas reacciones que tienen lugar en la formación de las ROS se muestran en el esquema siguiente (ver figura 5).



**Figura 5.** Producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno por reducción del oxígeno molecular.  $\text{Fe}^{2+}$ =ión ferroso;  $\text{Fe}^{3+}$ =ión férrico;  $\text{HClO}$ =ácido hipocloroso;  $\text{H}_2\text{O}$ =agua;  $\text{H}_2\text{O}_2$ =peróxido de hidrógeno;  $\text{HOONO}$ =radical dióxido de nitrógeno;  $\text{MPO}$ =mieloperoxidasa;  $\text{NO}^\bullet$ =óxido de nitrógeno;  $\text{NO}_2^\bullet$ =dióxido de nitrógeno;  $\text{O}_2$ =oxígeno;  $\text{O}_2^\bullet$ =anión superóxido;  $\text{OH}^\bullet$ =radical hidroxilo;  $\text{ONOO}^\bullet$ =peroxinitrito;  $\text{SOD}$ =superóxido dismutasa.

Cuando el oxígeno se reduce al radical anión superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) (que tiene alto poder reductor), éste puede reaccionar fácilmente con el  $\text{NO}$  produciendo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) (Beckman et al., 1990), que genera a su vez el radical dióxido de nitrógeno ( $\text{HOONO}$ ). El  $\text{O}_2^\bullet$ , mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa ( $\text{SOD}$ ) produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), un agente oxidante muy activo. El  $\text{O}_2^\bullet$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden dar lugar al radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), que probablemente es el radical más potente de todos, y este radical inicia una cadena de reacciones que forman peróxidos lipídicos y radicales orgánicos,

ocasionando graves alteraciones orgánicas y daño en el ADN. Por tanto, es importante que el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  se eliminen rápidamente de la célula, para así evitar la formación de  $OH^\bullet$ .

Las ROS llevan a cabo importantes funciones biológicas, como son las funciones defensivas (Donkó et al., 2005), y también actúan como vasodilatadores en la circulación cerebral (Miller et al., 2006; Terashvili et al., 2006). Regulan además diversas actividades enzimáticas (Nose, 2000; Galaris & Pantopoulos, 2008), e intervienen en la diferenciación celular, así como en procesos de apoptosis (Suzuki et al., 1997; Ozben, 2007; Chen et al., 2009). Pero cuando en un organismo se produce un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad del sistema biológico para detoxificar éstos productos reactivos, se produce el estrés oxidativo que causa daño celular y que está involucrado en el desarrollo de múltiples enfermedades (Finkel, 2003; Liu et al., 2005; Dröge & Schipper, 2007).

Existen varias estrategias de defensa celular frente a los procesos mediados por las ROS. Las sustancias que previenen de la oxidación, se denominan antioxidantes, y se define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente en concentraciones bajas respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Whiteman, 2004). Existen diferentes sistemas antioxidantes celulares, que están agrupados en tres categorías. Estas categorías corresponden a los sistemas antioxidantes primarios, secundarios y terciarios, que comentaremos brevemente a continuación.

Los sistemas antioxidantes primarios previenen la formación de los radicales libres y están constituidos por distintas enzimas que se encuentran dentro de la propia célula. Entre las enzimas que participan en los procesos antioxidantes celulares, podemos destacar la superóxido dismutasa, que cataliza la formación de  $H_2O_2$  a partir del radical  $O_2^-$ , la catalasa, que cataliza la conversión de  $H_2O_2$  directamente a agua, previniendo la generación de radicales  $OH\cdot$  (Sohal et al., 1990), y la glutatión peroxidasa (GPx), cuya función es eliminar hidroperóxidos orgánicos, como el radical (ROOH), y también hidroperóxidos inorgánicos como el  $H_2O_2$  (Weitzel et al., 1990). Los sistemas antioxidantes secundarios actúan como moléculas suicidas, oxidándose ellos al neutralizar los radicales libres. La gran mayoría son antioxidantes exógenos, y se requiere por lo tanto una continua aportación de estos sistemas o compuestos a través de la dieta, para que ejerzan su función. Algunos de estos antioxidantes exógenos son la vitamina C (o ácido ascórbico), la vitamina E (o tocoferol), el ácido úrico, los carotenoides, la melatonina y los algunos polifenoles. El glutatión reducido también se considera un sistema antioxidante secundario, ya que participa en la regeneración de los radicales  $\alpha$ -tocoferoxil mediante la actuación de la enzima GPx (Battin & Brumaghim, 2009). Por último, se consideran sistemas antioxidantes terciarios a algunas enzimas reparadoras del ADN, de las proteínas y de los lípidos, que en último término reparan también el daño oxidativo que sufren estas estructuras. A diferencia de los sistemas de defensa antioxidantes primarios y secundarios, los sistemas de reparación del daño oxidativo se han estudiado poco.

En condiciones patológicas, el aumento de la actividad de las ROS

produce una disfunción endotelial, aumento de la contractilidad del músculo liso vascular, crecimiento de este tejido, peroxidación lipídica, inflamación y aumento de los depósitos proteicos de la matriz extracelular, siendo todos estos factores determinantes en el daño vascular de la hipertensión (Diep et al., 2002; Taniyama & Griendling, 2003). La producción de ROS puede aumentar en otros órganos involucrados en el control de la presión arterial, tales como el corazón, el sistema nervioso y los riñones (Wilcox, 2003; Kishi et al., 2004; Touyz & Schiffrin, 2004; Münzel et al., 2008).

Aunque tradicionalmente se ha asumido que los macrófagos juegan un papel fundamental en la generación de ROS en la pared vascular (Cathcart & Folcik, 2000), todas las células de la pared vascular (endotelio, músculo liso vascular y células de la adventicia) producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos (Griendling et al., 2000). Ya se han comentado los principales sistemas enzimáticos que generan  $O_2^-$  y sus derivados. La importancia relativa de cada uno de estos sistemas va a depender del estado fisiológico o patológico de la pared vascular.

Es importante señalar que las ROS pueden reaccionar con el NO, disminuyendo así su biodisponibilidad en el lecho vascular (Beckman et al., 2003). La deficiencia en la vasodilatación mediada por el endotelio, que acontece en la hipertensión, se ha vinculado a una disminución en la biodisponibilidad del NO, y esta disminución en la biodisponibilidad del NO estaría condicionada por el aumento de las ROS propio de esta patología. Distintos estudios experimentales avalan esta idea. En pacientes con

hipertensión esencial se ha detectado una disminución de la cantidad de NO en el plasma (Node et al., 1997). Esta disminución en la biodisponibilidad del NO puede ser secundaria a la disminución en su síntesis o al aumento de su degradación como consecuencia de la interacción del NO con  $O_2^-$  para formar ONOO<sup>-</sup> (Landmesser et al., 2003). En algunos modelos experimentales de hipertensión, se ha descrito que la disminución de NO en plasma puede deberse a una disminución de la actividad de la NOS (Malinski et al., 1993; Cuevas et al., 1996; Chou et al., 1998), pero también se ha señalado que la biodisponibilidad del NO está condicionada por su destrucción por los radicales  $O_2^-$  existentes (Kerr et al., 1999; Ülker et al., 2003). En situaciones de hipertensión, en las que se produce estrés oxidativo, la inactivación del NO por las ROS parece que es, desde luego, un mecanismo importante para mantener el aumento del tono arterial (Dröge, 2002; Zalba et al., 2005). En pacientes hipertensos existe una mayor producción de ROS (Taddei et al., 2001) y un nivel más bajo de SOD (Kumar & Das, 1993). En algunos modelos animales de ratas hipertensas también se ha demostrado que existe una mayor producción de radicales  $O_2^-$  (Wu & Ding, 2001) y una elevación del sistema NADPH oxidasa (Fortuño et al., 2004; Touyz & Schiffrin, 2004). Las ROS producidas por la pared vascular en situaciones patológicas, afectan también a sistemas productores de otros factores vasodilatadores distintos del NO. Así, se ha demostrado que el ONOO<sup>-</sup> desacopla la NOS y también la PGI<sub>2</sub> sintasa, necesaria para la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Münzel et al., 2008).

### **1.1.3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial**

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la hipertensión son

fármacos *clásicos*, como los diuréticos y los betabloqueantes, y fármacos más *recientes o modernos* como los calcioantagonistas, los compuestos IECA y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARAII). El tratamiento óptimo de la hipertensión arterial es aquel que proporciona una reducción adecuada del valor de la presión arterial. La monoterapia solo controla en un 50% de los casos esta variable. En la mayoría de los pacientes el control de la presión arterial se consigue con la asociación de varios fármacos antihipertensivos, y hay que tener en cuenta, además, el riesgo cardiovascular que posee cada paciente.

### *Diuréticos*

Los diuréticos, son fármacos *clásicos* indicados preferentemente para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca, y están también indicados en pacientes de edad avanzada con hipertensión sistólica aislada y diabetes (Guía Española de Hipertensión Arterial, 2005). Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Sociedad Internacional de Hipertensión (ISH), en 2003, y según el VII Informe de la Junta del Comité Nacional en la Prevención, Detección, Evaluación, y Tratamiento de la Presión Sanguínea Alta (*Joint National Committee*), del mismo año, que se basa en los resultados de ensayos clínicos, disponibilidad y coste, estos fármacos deberían considerarse los medicamentos de primera elección en la mayoría de los pacientes sin indicaciones obligatorias para el empleo de otra clase de fármacos.

*Betabloqueantes*

Los betabloqueantes son fármacos seguros, eficaces y económicos. Las indicaciones de administración de estos fármacos son las distintas formas clínicas de la cardiopatía isquémica y determinadas arritmias. Existen diferentes contraindicaciones en el uso de éstos fármacos, como es el asma bronquial moderada-grave, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) moderada-grave y el bloqueo auriculoventricular grados 2-3. Existen varios ensayos clínicos en los que se ha demostrado la utilidad de la asociación de un betabloqueante con diuréticos, fármacos IECA y digoxina (Guía Española de Hipertensión Arterial, 2005).

*Alfabloqueantes*

En la mayoría de las guías actuales se establece que la indicación fundamental de los alfabloqueantes es la terapia de combinación con otros fármacos. Están indicados cuando la hipertensión se asocia con hipertrofia benigna de próstata y cuando se asocia con dislipidemia (Lepor et al., 1997; SEH/SEC, 2003).

*Calcioantagonistas*

Los calcioantagonistas son eficaces y bien tolerados como fármacos antihipertensivos. Los calcioantagonistas dihidropiridínicos están indicados en el tratamiento de la hipertensión sistólica aislada en adultos de edad avanzada, además de en el tratamiento de la cardiopatía isquémica. Se ha demostrado que los calcioantagonistas presentan capacidad antiaterosclerótica, con respecto a otros tratamientos clásicos (Borhani et al., 1996; Zanchetti et al.,



2002). Además, existe gran similitud en la eficacia de los diuréticos y los betabloqueantes, y la eficacia de los calcioantagonistas no dihidropiridínicos, en la prevención de las complicaciones cardiovasculares debidas al síndrome hipertensivo (Rosei et al., 1997; Hansson et al., 2000).

### *Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina*

Los fármacos IECA aportan una seguridad en la prevención de la enfermedad cardiovascular en el paciente hipertenso, similar a la de los fármacos *clásicos*. Los fármacos IECA están indicados básicamente en la insuficiencia cardiaca, y son eficaces en la prevención secundaria de esta enfermedad tras el infarto de miocardio, sobre todo en casos de disfunción ventricular. (CONSENSUS Trial Study Group, 1987; López-Sendón et al., 2004).

### *Antagonistas de los receptores de la angiotensina II*

Los ARAlI, son fármacos con características similares a los IECA, pero de mejor tolerancia. Existen diferentes estudios clínicos en los que se demuestra que el uso de ARAlI ofrece una protección cardiovascular superior al tratamiento con betabloqueantes en pacientes con hipertensión e hipertrofia ventricular izquierda (Dahlöf et al., 2002). Ofrecen mayores ventajas que los fármacos *clásicos* en el caso de pacientes con hipertensión sistólica aislada de edad avanzada (Kjeldsen et al., 2002). Además, la asociación de un ARAlI y un IECA presenta beneficios añadidos en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca (Pitt et al., 2000; Pfeffer et al., 2003; Yusuf et al., 2003).

Se muestran a continuación algunos de los fármacos antihipertensivos que más se utilizan (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Fármacos antihipertensivos comercializados en España para uso oral.

FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS		
DIURÉTICOS	Tiazídicos	Clortalidona
		Xipamida
	De Asa	Piretanida
		Furosemida
	Distales	Espironolactona
BETA Y ALFA BLOQUEANTES	Betabloqueantes	Atenolol
		Propranolol
	Alfabloqueantes	Carvedilol
		Labetalol
CALCIOANTAGONISTAS	Dihidropiridínicos	Nifedipino
	No dihidropiridínicos	Diltiazem
		Verapamil
IECA		Benazepril
		Captopril
		Enalapril
		Ramipril
		Quinapril
ARAI		Candesartán
		Irbesartán
		Valsartán
		Eprosartán

IECA = Inhibidores de la enzima convertidora en angiotensina

ARAI = Antagonistas de los receptores de la angiotensina II

### **1.1.4. Las ratas espontáneamente hipertensas como modelo experimental de hipertensión**

Para el estudio de algunas enfermedades son muy útiles los modelos animales que presenten características semejantes a las de los pacientes que las padecen. Estos modelos permiten identificar los diferentes factores de riesgo que pueden ser detonantes en la aparición de la enfermedad, y permiten estudiar los mecanismos implicados en su desarrollo y mantenimiento. También permiten conocer cómo se puede prevenir la enfermedad y estudiar sus posibles tratamientos. Los modelos experimentales de hipertensión arterial deben ser, fáciles de desarrollar, relativamente baratos, conseguirse con animales pequeños, y adecuados para determinar las propiedades terapéuticas de los diferentes agentes antihipertensivos. Conviene, además, que un determinado agente antihipertensivo se evalúe en distintos modelos, ya que puede actuar por distintos mecanismos (López-Miranda, 1997).

La localización anatómica de las diferentes arterias en la rata convierte a este animal en el más idóneo para la investigación de sustancias antihipertensivas. La arteria de la cola de la rata permite llevar a cabo medidas incruentas de presión arterial y, para ello, se utiliza un pequeño manguito inflable y un transductor de presión semejante a un esfigmomanómetro. La rata presenta, por otra parte, un tamaño muy adecuado que facilita su manejo, y su coste es relativamente bajo. Se han desarrollado diferentes modelos experimentales de hipertensión arterial en ratas, siendo los de origen genético los más utilizados por los investigadores. Ello se debe a que el desarrollo de la

hipertensión en estos modelos es muy parecido al desarrollo de la hipertensión en humanos. Se sabe que la aparición de hipertensión arterial esencial depende de diferentes factores genéticos que predisponen, en muchos casos, a que la descendencia de pacientes hipertensos presente también niveles elevados de presión arterial. Esta predisposición, junto con factores medioambientales, que incluyen la dieta y diversos factores sociales, puede facilitar la aparición de alteraciones cardiovasculares y de hipertensión arterial. Por todo ello, se ha intentado conseguir razas de ratas hipertensas mediante cruces cosanguíneos. Okamoto y Aoki en 1963, hicieron cruces entre hermanos de la raza Wistar que presentaban niveles de presión arterial más altos que los normales. A partir de la sexta generación endogámica consiguieron una nueva raza de ratas, que se conocen hoy día como ratas espontáneamente hipertensas (SHR), ya que su PAS aumenta hasta alcanzar valores en muchos casos superiores a 190 mm Hg (Okamoto & Aoki, 1963). Estos autores comprobaron también que los valores de la PAS de las ratas SHR no podían considerarse totalmente estables hasta que los animales tenían aproximadamente 20 semanas de vida. Se estableció que el control normotenso de estos animales eran las ratas Wistar criadas en la Universidad de Kyoto. Estas ratas reciben el nombre de ratas Wistar-Kyoto (WKY) y hoy día se consiguen también de otros laboratorios. Es importante destacar que algunos investigadores, teniendo en cuenta como se desarrolló el modelo experimental de hipertensión de las ratas SHR, consideran a las ratas WKY como animales prehipertensos (Wright & Rankin, 1982). La esperanza de vida media de las ratas espontáneamente hipertensas, en condiciones normales de cuidado y mantenimiento, es de 18 meses, mientras que las ratas WKY suelen

vivir unos 24 meses.

Ya se ha adelantado que el desarrollo de la hipertensión arterial es muy semejante en las ratas SHR y en la especie humana. En ambos casos la hipertensión arterial se instaura en edades tempranas y está condicionada genéticamente, existiendo por ello un importante factor de agregación familiar. También en ambos casos los niveles de presión arterial van aumentando paulatinamente a lo largo de la vida como consecuencia del incremento progresivo de las resistencias vasculares periféricas. Además, la hipertensión arterial en ambos casos se agrava por la ingesta de una dieta rica en sodio, por el estrés, y por otros factores ambientales. No obstante, existen algunas diferencias entre la hipertensión arterial humana y la hipertensión arterial de las ratas SHR. Así, por ejemplo, los pacientes hipertensos suelen tener un exceso de peso en comparación con las personas normotensas, pero las ratas SHR pesan menos que sus controles normotensos. Se ha descrito además una alteración en la función tiroidea de las ratas SHR, pero no todos los pacientes hipertensos presentan este tipo de alteración. Desde el punto de vista terapéutico, hay también que señalar que las ratas SHR no muestran una respuesta muy definida a los diuréticos, pero el uso de estos fármacos es altamente efectivo para reducir la presión arterial en los pacientes hipertensos. Otra diferencia importante es que la aparición de arteriosclerosis en personas hipertensas es muy frecuente, pero, sin embargo, las ratas parecen mostrar cierta resistencia a su desarrollo (Trippodo & Frohlich, 1981).

## **1.2. COMPONENTES ALIMENTARIOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA**

Hoy en día se sabe que además de las propiedades nutricionales, los componentes de los alimentos pueden ejercer distintas actividades biológicas y pueden producir en el organismo un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas (Diplock et al, 1998). En los últimos años, estos componentes alimentarios con actividad biológica se están utilizando para desarrollar los alimentos denominados, alimentos funcionales. En realidad, desde tiempos inmemorables, se ha atribuido a ciertos alimentos un efecto beneficioso para la salud. La célebre frase de Hipócrates “qué tu alimento sea tu única medicina, y tu medicina sea tu único alimento” hoy en día tiene fundamento científico, ya que los alimentos suministran nutrientes pero, además, ciertos alimentos aportan componentes biológicamente activos que ayudan a prevenir el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, o ayudan a atenuar los síntomas de las mismas, y por tanto, promueven un buen estado de salud.

Japón fue el país pionero en cuanto al uso de los alimentos funcionales (*Functional Foods*) término que aparece por primera vez hace aproximadamente 20 años. En la década de los 80, se publicó en Japón un reglamento en el que se incluía la legislación específica para la comercialización y etiquetado de los “Alimentos para uso específico de la salud” (alimentos funcionales). En la Unión Europea se ha creado también una Comisión Europea de Acción Concertada sobre la Ciencia de los Alimentos

Funcionales (*Functional Food Science in Europe (FUFOSE)*), que regula la información dirigida al consumidor sobre los efectos favorables que este tipo de alimentos ejercen en la salud y la prevención de enfermedades. El Instituto Internacional de Ciencias Biológicas en Europa (*International Life Sciences Institute (ILSI) Europe*), tiene como objetivo, desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que respaldan el desarrollo de productos alimenticios que puedan tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica, que puedan mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo y/o reducir el riesgo de que desarrolle enfermedades, quedando así definido el concepto de alimentos funcionales. Actualmente, la reglamentación europea exige que se demuestren científicamente las propiedades funcionales alegadas incluyendo estudios de intervención en humanos, y recomienda además que se establezcan los mecanismos de acción de los componentes activos presentes en estos alimentos (Reglamento (CE) N° 1924/2006). Esta nueva regulación está cambiando totalmente el panorama actual de los alimentos funcionales, y sólo los componentes aprobados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Agency (EFSA)*) podrán ser comercializados con alegaciones de salud.

En los últimos años, los estudios sobre la actividad biológica de los componentes alimentarios se han centrado principalmente en investigaciones *in vitro*, seguidas de experimentos con animales, y existe un importante avance, aunque todavía insuficiente, en el número de ensayos de intervención en humanos. En la actualidad, el diseño riguroso de un alimento funcional requiere además conocer a nivel molecular los mecanismos implicados en la

actividad biológica de sus componentes. En realidad, una de las líneas de estudio más innovadoras dentro de la investigación sobre los alimentos funcionales se centra en la investigación del efecto de los componentes de los alimentos en la expresión génica (Lattka et al., 2009). La nutrigenómica se encarga de estudiar como los nutrientes regulan la expresión de los genes, y como se interrelacionan estos cambios con aspectos proteómicos y metabolómicos. Ésta es una de las principales líneas de evolución en el estudio de la actividad biológica de los componentes alimentarios.

Hasta el momento, se ha descrito un elevado número de componentes alimentarios con actividad biológica (ver tabla 3). En los últimos años son muchas además las evidencias científicas que se han publicado sobre las propiedades biológicas atribuidas a estos componentes. Sin embargo, en la actualidad quedan todavía bastantes interrogantes relacionados con el consumo de estos componentes alimentarios y sus efectos sobre la salud. Es desde luego, importante identificar los posibles mecanismos de acción a nivel celular y molecular implicados en su actividad biológica (Farzaneh-Far et al., 2010), así como la investigación de nuevas actividades biológicas y dianas terapéuticas (Li et al., 2004; Masterton et al., 2010). También es importante el desarrollo de metodologías para la detección de estos componentes en los fluidos biológicos, ya que en algunos casos los componentes alimentarios se perfilan como nuevos biomarcadores (García-Villalba et al., 2010; Salm et al., 2010). Por otro lado, investigar y mejorar la biodisponibilidad de cada uno de los componentes alimentarios es clave para entender sus efectos sobre la salud humana.



Otro importante reto es la investigación de los efectos sinérgicos de cada uno de los componentes alimentarios con otros componentes alimentarios (Medina et al., 2010; Robertfroid et al., 2010) o con fármacos (Scholle et al., 2009). Será además necesaria la validación de los métodos que se utilizan para evaluar la actividad biológica de los componentes de los alimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que permitirá realizar comparaciones entre los diferentes estudios (Wagner et al., 2009). Además, se está introduciendo la idea de mezclar determinados componentes de los alimentos para utilizarlos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o desórdenes multifactoriales (Bakker et al., 2010).

Por último, es importante tener en cuenta que en algunos casos es difícil llegar a las dosis necesarias de estos componentes de los alimentos para conseguir el efecto deseado en la población general. Por ello, estos componentes bioactivos cada vez se añaden a más y más alimentos, y el desarrollo de nuevos productos y procesos para incorporar estos componentes en nuevos alimentos se considera también una línea de evolución importante (Bourre, 2005). Esto implica la necesidad de llevar a cabo más estudios de intervención en humanos que confirmen su seguridad, ya que también existe el riesgo de que un consumo elevado de estos componentes alimentarios pueda producir efectos nocivos (Cicero et al., 2010; Saravanan et al., 2010).

A continuación se muestra una tabla con algunos de los componentes bioactivos procedentes de los alimentos y su efecto beneficioso para la salud.

**Tabla 3.** Componentes alimentarios con actividad biológica.

COMPONENTE BIOACTIVO	ALIMENTO DE ORIGEN	FUNCIÓN
<b><u>POLIFENOLES</u></b>  <b>FLAVONOIDES</b> Flavanoles (catequina, epicatequina, procianidinas) Flavonoles (quercetina) Flavonas (luteolina, apigenina) Isoflavonas (genisteína, daidzeína) <b>ESTILBENOS</b> Resveratrol	Cacao, té verde, cebolla, alcaparra, manzana, pimienta, chocolate, habas, frutos secos, soja y derivados, uva, vino tinto, grosella negra, arándanos	Antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria, mejora el perfil lipídico, antiestrógena, antiosteoporosis, antiproliferativa, anticancerígena, antibacteriana, antivírica, cardioprotectora, neuroprotectora
<b>PROTEÍNAS</b> Proteínas lácteas (inmunoglobulinas, lactoferrina, seroalbúmina, $\beta$ -lactoglobulina, $\alpha$ -lactalbúmina, lactoperoxidasa) Proteínas de Soja	Leche y productos lácteos, tofu, harina y semillas de soja	Antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, fuente de aminoácidos, aumenta la respuesta inmune, anticancerígena, hipocolesterolemizante, cardioprotectora, antiosteoporosis
<b>ÁCIDOS GRASOS</b> Ácido linoleico conjugado (CLA) Ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -3	Grasa láctea, caballa, arenque, salmón, trucha, atún, gamba	Anticancerígena, reducción de grasa corporal en obesos, aumento de los niveles de leptina plasmática, aumento de la respuesta inmune, cardioprotectora
<b>TERPENOS</b> Carotenoides (luteína, $\alpha$ y $\beta$ -caroteno, licopeno, zeaxantina, $\beta$ -cryptoxantina) Limonoides	Tomate, zanahoria, pimienta roja, espinacas, albaricoque, sandía	Anticancerígena, antioxidante beneficio cardiovascular
<b>FITOESTEROLES</b> Esteroles Estanoles	Coliflor, coles de bruselas, zanahoria, naranja, manzana, aceite de oliva, aceite de girasol	Hipocolesterolemizante
<b>FIBRA DIETÉTICA</b> Soluble Insoluble	Cereales, frutas	Anticancerígena, antihipertensiva, hipocolesterolemizante, hipolipémizante
<b>VITAMINAS y MINERALES</b>	Frutas, verduras, hortalizas productos lácteos grasos, frutos secos, carne roja	Antioxidante, antiosteoporosis, prevención de bocio y de enfermedades dentales, antihipertensiva
<b>PROBIÓTICOS y PREBIÓTICOS</b>	Bebidas lácteas, yogures, postres lácteos, frutas y verduras	Regulación del tracto intestinal, protección del epitelio intestinal, reducción de infecciones gastrointestinales y urogenitales

### 1.3. FIBRA DIETÉTICA

#### 1.3.1. Definición y clasificación

La "teoría de la fibra" surgió hace más de 30 años, partiendo de las observaciones de Trowell y de Barkitt. Ésta teoría propuso que una alimentación alta en fibra y carbohidratos sin refinar, protege frente a muchas enfermedades occidentales como son el estreñimiento, la diverticulosis, el cáncer de colon, la diabetes, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares (Barkitt et al., 1974).

La fibra dietética puede definirse como la parte comestible de las plantas y los análogos de los hidratos de carbono, que siendo resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, sufren fermentación completa o parcial en el intestino grueso, según la Asociación Americana de Químicos de Cereales (*American Association of Cereal Chemists (AACC) International*, 2001). La fibra dietética puede clasificarse según su grado de solubilidad, o teniendo en cuenta su grado de fermentación. Por su solubilidad, podemos clasificarla en fibra insoluble, que como su nombre indica está integrada por sustancias que no se pueden disolver en agua (celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón), y en fibra soluble, formada por componentes solubles en agua y con capacidad para formar geles, que confieren volumen a las heces (inulina, pectinas, gomas y fructooligosacáridos). Por otra parte, se consideran fibras no fermentables las que resisten la acción de los microorganismos del intestino. Las fibras no fermentables son principalmente las fibras insolubles. Por el contrario, las fibras fermentables, que son principalmente fibras solubles, se definen como aquellas

fibras que pueden ser degradadas por la microflora intestinal. Este proceso de degradación, depende en parte del grado de solubilidad y del tamaño de las partículas, por lo que las fibras más solubles y con un tamaño de partícula más pequeño tienen un mayor y más rápido grado de fermentación.

La fibra influye significativamente en el grado de absorción de los diferentes nutrientes, pues en el estómago aumenta la viscosidad y retrasa el vaciado gástrico. Una vez en el intestino delgado, la capacidad de la fibra para absorber algunos nutrientes y la actividad de las enzimas digestivas, provocan un retraso en la velocidad de paso de los nutrientes a la sangre. En el colon la fibra es fermentada por la acción de la flora bacteriana (Saura, 1997). Los principales efectos asociados al paso de la fibra a través del tracto gastrointestinal son la sensación de saciedad, el aumento de la excreción, el retraso de la absorción de la glucosa, la acción hipocolesterolémica, la disminución del tiempo en el tránsito intestinal de los alimentos, la mayor excreción de grasa y proteína y, por último el mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana intestinal.

Existen, de hecho, diversos estudios que corroboran que la ingesta de fibra dietética está asociada a la protección frente al desarrollo de diferentes desórdenes metabólicos como la obesidad (McKeown et al., 2002; Bazzano et al., 2005; Athanasios Papathanasopoulos et al., 2010; James et al., 2010), la diabetes *mellitus* tipo 2 (Artiss et al., 2006; He et al., 2010), y las enfermedades cardiovasculares (Flight, 2006; Wannamethee et al., 2009; Graziano et al., 2012; Eman et al., 2012). La fibra disminuye además el riesgo de padecer

cáncer de colon o recto (Du, 2010), y desde hace mucho también se ha señalado que puede favorecer la disminución de los valores del colesterol sanguíneo (Kritchevsky, 1987; Lipsky et al., 1990; Knopp et al., 1999; Nicolosi et al., 1999; Jenkins et al., 2003; Kerckhoffs et al., 2003; Rideout et al., 2008; Wannamethee et al., 2009; James et al., 2010). Las reducciones del colesterol plasmático, observado después del consumo de fibra soluble, es también asociado con mejoras en la vasodilatación endotelial (Anderson et al., 1995; Vogel et al., 1995; El Khoury et al., 2011).

### **1.3.1.1. Fibra soluble**

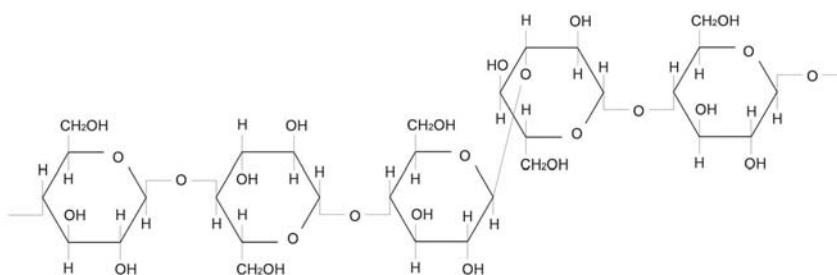
Como ya hemos señalado, la fibra soluble está formada por algunos componentes solubles en agua y con capacidad para formar geles en el tracto gastrointestinal, que confieren volumen a las heces. Este tipo de fibra tiene la propiedad de retardar la evacuación gástrica, y puede ser saludable en algunos casos, ya que puede hacer más eficiente la digestión y absorción de los alimentos, generando saciedad. La fibra soluble predomina en las legumbres, en los cereales (avena y cebada) y en algunas frutas. Cuando se ingiere, los microorganismos intestinales, especialmente la flora del colon, la utilizan y producen su fermentación. Por ello, a este tipo de fibra la denominamos también fibra fermentable.

Algunos de los productos que evaluaremos en esta Tesis Doctoral están compuestos por fibra soluble. Concretamente, evaluaremos un producto rico en betaglucano y otro producto rico en chitosan, ambos de procedencia industrial. Comentaremos a continuación lo que son y donde se encuentran localizadas

estas dos fibras en la naturaleza.

### - **Betaglucano**

El betaglucano se encuentra en las paredes de las células del endospermo de los granos de los cereales, como la cebada y la avena. La estructura del betaglucano está formada por polisacáridos no ramificados de  $\beta$ -D-glucosa, como la celulosa, pero con un enlace  $1\beta\rightarrow3$  por cada tres o cuatro enlaces  $1\beta\rightarrow4$  (ver figura 6). El betaglucano forma moléculas largas y cilíndricas que pueden contener hasta 250.000 unidades de glucosa. Se usa comercialmente para sustituir grasas y para modificar la textura de algunos productos alimenticios. Se ha descrito que el consumo de betaglucano ayuda a reducir las enfermedades del corazón disminuyendo los niveles de colesterol y glucosa en sangre (Smith et al., 2008; Talati et al., 2009; Abumweis et al., 2010).

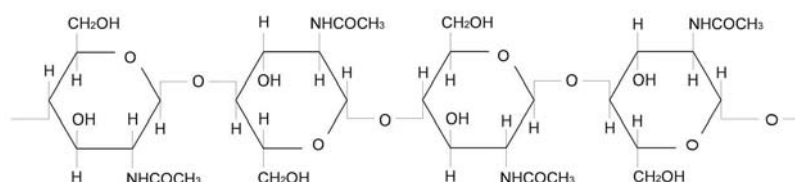


**Figura 6.** Estructura molecular del betaglucano

### - **Chitosan**

El chitosan es una fibra de origen marino, que se obtiene de la quitina, un polímero no ramificado de N-acetil-D-glucosamina. La quitina se puede considerar un derivado de la celulosa, en el cual los grupos hidroxilos del

segundo carbono de cada glucosa se han reemplazado por grupos acetamido ( $-\text{NH}(\text{C}=\text{O}) \text{CH}_3$ ) (ver figura 7). Esta sustancia se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, pues es el polímero natural más abundante en ella después de la celulosa (Heller et al., 1959). Se localiza en las paredes celulares de los hongos y en los exoesqueletos de algunos artrópodos y de otros animales inferiores. Los exoesqueletos de los crustáceos constituyen una de las principales fuentes de quitina. El quitosán, que como hemos comentado, es una fibra que se obtiene tras el procesado de la quitina, tiene una enorme cantidad de aplicaciones en áreas muy diversas (Lorenzo et al., 1994; Lorenzo et al., 1995). En los últimos años, se ha dedicado especial atención al estudio de sus propiedades beneficiosas para la salud (Baïgarin et al., 2009; Chaudhury & Das, 2011; Dello Staffolo et al., 2011; Walsh et al., 2013).



**Figura 7.** Estructura molecular de la quitina.

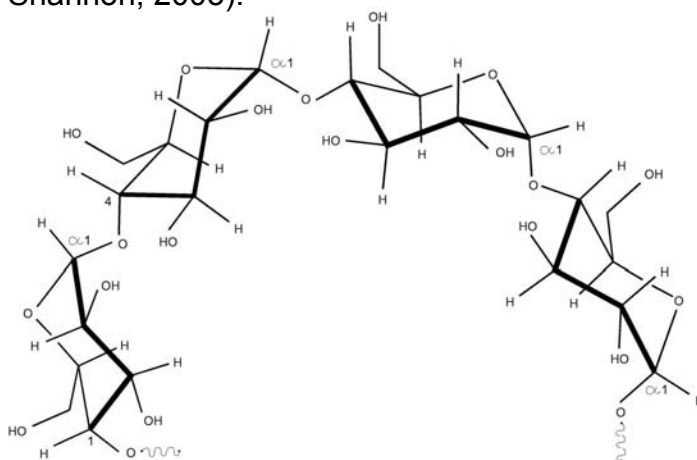
### 1.3.1.2. Fibra insoluble

La fibra insoluble está integrada por sustancias que no se disuelven en agua. Como ya hemos indicado, generalmente sus componentes resisten la acción de los microorganismos del intestino, por lo que a esta fibra la podríamos considerar no fermentable. En ésta Tesis Doctoral, evaluaremos un producto rico en almidón resistente, por lo que comentaremos a continuación

como está constituido y donde se encuentra el almidón en la naturaleza.

El almidón es un polisacárido, constituido por numerosas unidades idénticas de monosacáridos, unidos entre sí por enlaces glucosídicos. Este polisacárido recibe el nombre de “homopolisacárido”, ya que únicamente está constituido por un tipo de monosacárido, usualmente glucosa. Este polímero de glucosa representa la mayor reserva de hidratos de carbono en los tubérculos de la planta y el endospermo de las semillas, y es el polisacárido digerible más abundante e importante en la naturaleza (López & Suárez, 2002). El almidón está realmente constituido por dos tipos de polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina, que describiremos a continuación.

La amilosa es una polímero lineal constituido por residuos de D-glucosa unidos entre sí por enlaces tipo  $\alpha$  1-4, en forma regular y lineal, originando una verdadera cadena que adopta una estructura helicoidal (ver figura 8) (López & Suárez, 2002). Está formada por 250 a 300 unidades de glucosa, que unidas forman una espiral. El almidón de maíz contiene entre un 25% y un 30% de amilosa (Boyer & Shannon, 2003).



**Figura 8.** Estructura molecular de la amilosa.



La amilosa retrogradada constituye lo que conocemos como almidón resistente (AR), ya que escapa a la acción de las enzimas digestivas y no se absorbe en el intestino delgado. Por este motivo, se considera una fibra dietética. El AR se define realmente como el almidón y la suma de los productos de la degradación del almidón, que no se absorben en el intestino delgado de individuos sanos y que alcanzan el intestino grueso, donde sufren un grado de fermentación variable por la microflora (Cummings & Englyst 1991; Englyst et al., 1992; Asp, 1992). El AR se encuentra de forma natural en algunas frutas (Lehman et al., 2002; Bello-Pérez et al., 2006), leguminosas (Vargas-Torres et al., 2006) y tubérculos (Lösel & Claus, 2005), y puede formarse también después de someter al almidón a un tratamiento térmico. Su concentración en los alimentos se encuentra fuertemente relacionada con la proporción amilosa/amilopectina y con la longitud de las cadenas de estos polímeros. Los diferentes tipos de AR son los que señalamos a continuación (Champ, 2004).

**AR1** (atrapado): Este tipo de almidón es físicamente inaccesible, se encuentra en los granos del cereal y resiste la digestión en el intestino delgado.

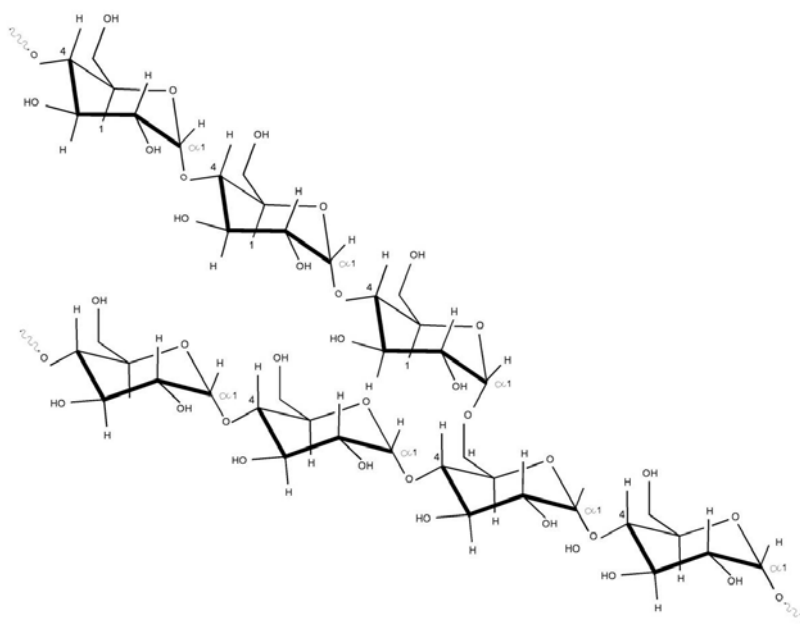
**AR2** (cristalizado): Resiste la digestión en el intestino delgado, aunque puede ser digerido si se gelatiniza. Se encuentra generalmente en el maíz y en las patatas.

**AR3** (retrogradado): Resiste a la digestión en el intestino delgado, debido a que es capaz de cambiar su conformación dependiendo de la temperatura a la que se somete. Al calentar el almidón en presencia de agua, se produce una distorsión en las cadenas de polisacáridos, adquiriendo una

conformación al azar. Este proceso se denomina gelatinización. Al enfriarse, comienza un proceso de cristalización, llamado retrogradación y así se consigue el AR3.

**AR4:** Químicamente modificado, resistente a la digestión en el intestino delgado.

La amilopectina es un polímero ramificado formado por miles de unidades de glucosa interconectadas por enlaces de tipo  $\alpha$  1-4, con ramificaciones formadas por enlaces de tipo  $\alpha$ 1-6 (ver figura 9). Las ramificaciones tienen lugar cada 15 y 30 unidades de glucosa, estableciéndose el enlace entre el carbono 1 de la molécula de glucosa que está en la rama, y el carbono 6 de la unidad de glucosa que se une a la ramificación (Charley, 1998). Esta organización estructural es la que confiere forma de arbusto a la amilopectina, haciéndola menos dispersa en el agua. El almidón de maíz contiene entre un 70% y un 75% de amilopectina (Boyer & Shannon, 2003).



**Figura 9:** Estructura molecular de la amilopectina.

## INTRODUCCIÓN

La composición del almidón está determinada genéticamente, y este polisacárido debe sus propiedades funcionales a sus dos componentes moleculares principales, amilosa y amilopectina, así como a la organización física de las macromoléculas en la estructura del gránulo (Bello-Pérez et al, 2006).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS**

Algunas fibras dietéticas, y en particular el producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) que estudiaremos más detalladamente en esta Tesis Doctoral, además de poder disminuir factores de riesgo cardiovascular como el sobrepeso, la hipercolesterolemia o la hiperglucemia, pueden también controlar la presión arterial, y resultar por ello útiles en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

### **2.2. OBJETIVOS**

El objetivo de esta Tesis Doctoral es estudiar el efecto de un producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), y compararlo con el efecto que otras fibras dietéticas [almidón hi-maize 260 (AHM), beta glucan 0,75 mm (BETA-G) y chitosan 95 (CHIT)] presentan sobre esta variable. Intentamos dilucidar además los mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo de PFSC. Este objetivo general se desglosó en distintos objetivos más concretos que señalamos a continuación:

1º. Evaluar el efecto de la administración aguda de PFSC y de las fibras dietéticas anteriormente mencionadas sobre la presión arterial de ratas SHR.

2°. Evaluar el efecto de la administración crónica de PFSC sobre la presión arterial, el peso corporal, la ingesta sólida, la ingesta líquida, la glucemia y el perfil lipídico de ratas SHR.

3°. Realizar determinaciones en el plasma y el hígado de las ratas SHR tratadas con PFSC, que nos permitan dilucidar si el efecto antioxidante de este compuesto, o su posible capacidad para inhibir el sistema renina-angiotensina, pueden justificar la disminución de la presión arterial que ocasiona.

4°. Realizar ensayos en ratas SHR y en preparaciones de anillos de aorta de estas ratas, que permitan caracterizar el efecto relajante vascular de PFSC en este tejido, y establecer la implicación de los factores endoteliales vasodilatadores en el efecto antihipertensivo de este compuesto.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

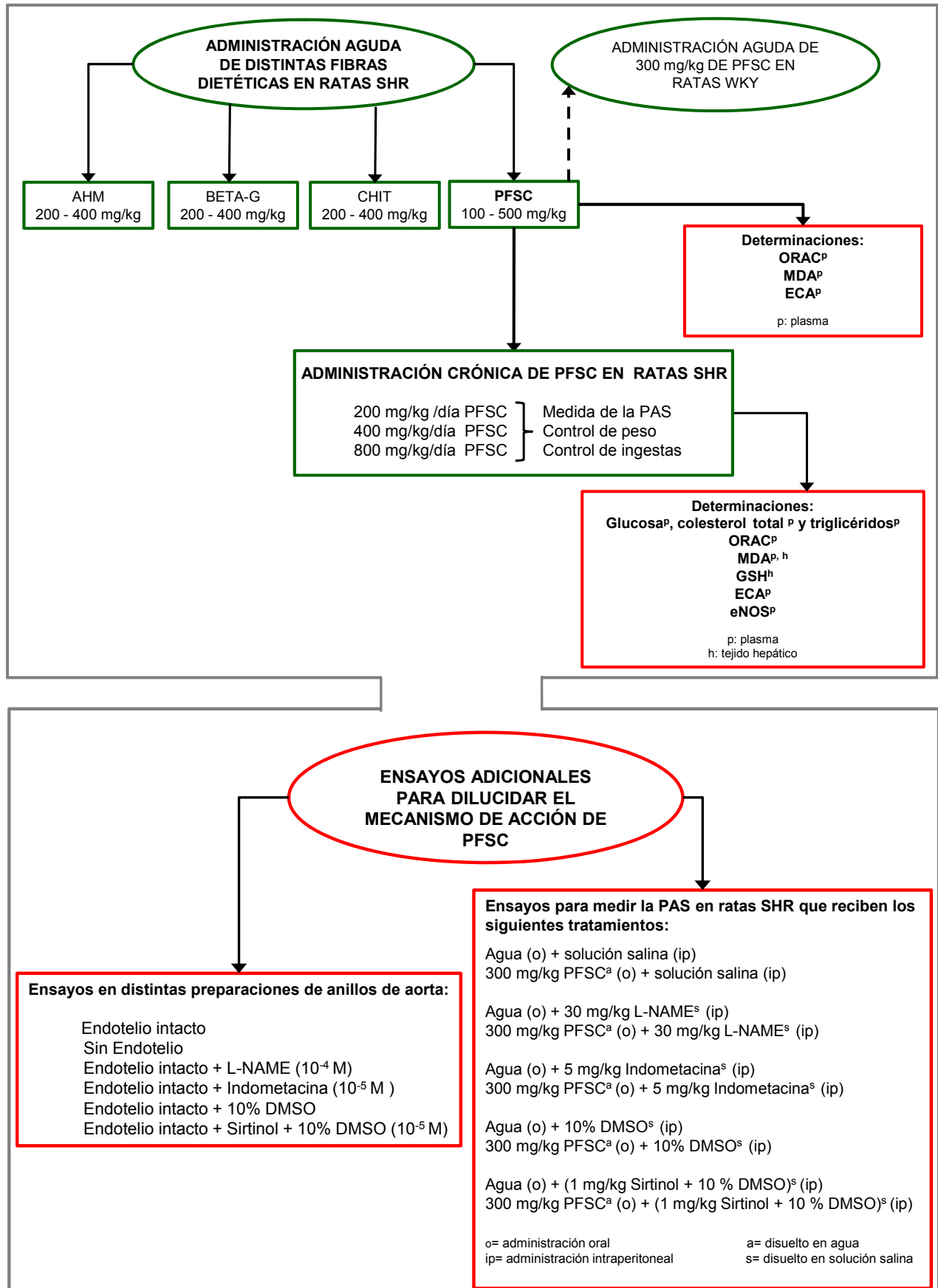




### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta Tesis Doctoral, en primer lugar, evaluamos el efecto agudo de diferentes fibras dietéticas sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Las fibras que se administraron de forma aguda a estas ratas fueron: almidón hi-maize 260 (AHM), beta glucan 0,75 mm (BETA-G), chitosan 95 (CHIT) y un producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC). Este último producto, el único que mostró efecto antihipertensivo en las ratas SHR tras su administración aguda, se administró también por el mismo procedimiento a un grupo de ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY). Se determinó asimismo la capacidad antioxidante total del plasma de las ratas tratadas de forma aguda con PFSC, y se determinaron los niveles plasmáticos de malonildialdehído (MDA) de estos animales, así como la actividad que tenía la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en estas muestras de plasma. Estudiamos después la modificación de la presión arterial sistólica (PAS) producida por la administración crónica de PFSC en las ratas SHR, y realizamos distintas determinaciones en el plasma y en el tejido hepático de estos animales, para dilucidar los mecanismos por los cuales este compuesto era capaz de modificar la PAS. Concretamente, determinamos la capacidad antioxidante del plasma de estos animales, sus niveles plasmáticos de glucosa, colesterol total, triglicéridos y MDA, y también la actividad que tenían en estas muestras de plasma las enzimas ECA y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Asimismo, se determinaron los niveles de MDA y glutatión reducido (GSH) en el tejido hepático de estos animales. Algunos ensayos adicionales en ratas SHR y en preparaciones de anillos de aorta de ratas de esta raza,

complementaron la experimentación de esta Tesis Doctoral y permitieron estudiar de una forma más concreta la implicación de los factores vasodilatadores endoteliales en los efectos antihipertensivos de PFSC. Concretamente, se estudió el efecto de PFSC en preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR con endotelio intacto y en preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR sin endotelio, y también se estudiaron los efectos de este compuesto en preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR con el endotelio intacto que se incubaban alternativamente con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), Indometacina, o Sirtinol. Se evaluó asimismo la modificación de la PAS producida por la administración aguda de PFSC en ratas SHR que recibían también alternativamente tratamiento intraperitoneal con L-NAME, Indometacina o Sirtinol. La figura 10 muestra un esquema de la experimentación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral.



**Figura 10.** Esquema de la experimentación realizada con distintas fibra dietéticas; WKY=Ratas Wistar-Kyoto; SHR=Ratas espontáneamente hipertensas; AHM=Almidón

hi-maize 260, fibra dietética insoluble; BETA-G=Beta glucan 0,75 mm, fibra dietética soluble; CHIT=Chitosan, fibra dietética soluble; PFSC=Producto rico en fibra soluble de cacao, fibra dietética soluble; ORAC=Oxygen radical absorbance capacity=Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno; MDA=Malonildialdehído; ECA=Enzima convertidora de angiotensina; eNOS=Óxido nítrico sintasa endotelial; PAS=Presión arterial sistólica; GSH=Glutación reducido; DMSO=Dimetilsulfóxido (disolvente orgánico); L-NAME= $N^G$ -nitro-L-arginina-metil-ester.

Todos los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral cumplen la normativa de experimentación animal (Directiva Europea 86/309/CEE y el Real Decreto 223/1988 del Ministerio Español de Alimentación Agricultura y Pesca.) Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, (BOE nº 252, de 21 de octubre).

Se describen a continuación los productos ricos en fibra dietética que se utilizaron y los estudios concretos que se realizaron en esta Tesis Doctoral.

### 3.1. FIBRAS DIETÉTICAS

#### 3.1.1. Almidón hi-maize 260

El almidón hi-maize 260 (AHM) es un producto rico en **fibra insoluble**, que nos suministró la empresa *National Starch Food Innovation* (Manchester, United Kingdom) para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Este producto se obtiene a partir del grano procedente de una especie híbrida de maíz con un alto contenido en amilosa, que se ha desarrollado a

través de un proceso de fitomejora natural. Su obtención conlleva una etapa de molienda en húmedo y un posterior tratamiento con calor seco, consiguiéndose así un polvo fino, con un tamaño de partícula comprendido entre 10 y 15  $\mu\text{m}$ , de color blanco y sabor suave. AHM es un almidón resistente tipo 2, con un alto contenido en fibra dietética (aproximadamente 60%), de la cual, más de la mitad es fibra insoluble (aproximadamente 33,6%). AHM posee un contenido calórico de 1,6 kcal/gramo ([www.foodinnovation.com](http://www.foodinnovation.com)). La tabla 4 muestra la composición nutricional de AHM.

**Tabla 4.** Composición nutricional de AHM (g/100g muestra). La fibra se analizó por el método establecido por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Método AOAC 985.29 y 991.43).

Carbohidratos	87
Humedad	11
Fibra dietética total*	56
Fibra insoluble	33,6
Grasa total	0,8
Proteínas	0,8
Calcio	0,02
Hierro	0,002

### 3.1.2. Beta glucan 0,75 mm

Beta glucan 0,75 mm (BETA-G) es un producto rico en **fibra soluble**, que nos suministró la empresa *Trades S.A. ingredientes naturales* (Barcelona,

España) para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

BETA-G procede de la planta de la cebada, que botánicamente pertenece al grupo de las gramíneas. Este producto se obtiene a partir de un proceso enzimático, en el cuál se inhibe la actividad de la betaglucanasa, evitando la hidrólisis del betalugano. BETA-G contiene un 54% de fibra dietética total. De esta cantidad de fibra, entre un 30% y un 35% es fibra soluble, y más de un 23% de esta fibra soluble es betaglucano, un polisacárido no amiláceo que está compuesto por moléculas de glucosa que forman largos polímeros con enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  y enlaces  $\beta(1\rightarrow3)$ . El peso molecular del betaglucano varía entre 50 y 2000 kDa. BETA-G es un polvo de grano grueso, de aspecto fibroso, con un tamaño de partícula inferior a 1,5 mm y de color marrón claro. Su contenido calórico es de 2,7 kcal/g. La tabla 5 muestra la composición nutricional de BETA-G.

**Tabla 5.** Composición nutricional de BETA-G (g/100g muestra)

Carbohidratos	19
Humedad	10
Fibra soluble total	30
Betaglucano	23
Grasa total	0,8
Proteínas	18
Sal	0,5

### 3.1.3. Chitosan 95

El Chitosan 95 (CHIT) es una **fibra soluble**, que nos suministró la empresa *Trades S.A. ingredientes naturales* (Barcelona, España) para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

CHIT se obtiene a partir del exoesqueleto del camarón *Pandalus borealis*. Para su extracción, es necesario procesar la quitina obtenida del exoesqueleto procedente del crustáceo, y realizar un tratamiento alcalino de la misma a alta temperatura. De éste modo se obtiene un polisacárido compuesto de cadenas distribuidas de manera aleatoria tanto de  $\beta(1-4)$  D-glucosamina (unidades deacetiladas) cómo de N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El producto final se presenta como un polvo fino, de color amarillo, y el 100% de su composición son carbohidratos.

### 3.1.4. Producto rico en fibra soluble de cacao

El producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) es un producto con un alto contenido de **fibra soluble**, que nos suministró la empresa *Natraceutical Group* (Valencia, España) para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

PFSC se obtiene a partir de la cascarilla del cacao. En el proceso de fabricación del polvo de cacao, el grano se fermenta, se seca, y se limpia antes de separar la cascarilla y la granilla. La granilla se utiliza a continuación para fabricar el polvo de cacao, y la cascarilla, que es rica en fibra insoluble, se



separa y se destina usualmente a otros fines. Puede, no obstante, obtenerse fibra soluble a partir de la cascarilla del grano de cacao por un procedimiento diseñado y patentado por *Natraceutical Group* (Moulay, 2007), que explicamos a continuación y que es, en realidad, el proceso de fabricación de PFSC.

La materia prima para obtener PFSC es, por lo tanto, la cascarilla de cacao. Esta cascarilla se esteriliza inicialmente en reactores diseñados para soportar temperaturas superiores a 100 °C y presiones altas, por ejemplo 140 °C y 1,5 bares. Se puede utilizar vapor sobresaturado directo o indirecto. El tiempo de esterilización es preferiblemente mayor de 5 minutos.

Después de la etapa de esterilización, el producto se somete a un proceso de hidrólisis enzimática. Para llevar a cabo la hidrólisis, la materia prima esterilizada se mezcla con agua. La relación apropiada de materia prima:agua oscila entre 1:5 y 1:15. A continuación, la temperatura del proceso se estabiliza entre 50 °C y 70 °C. En estas condiciones, el pH de la mezcla se encuentra entre 4,5 y 5,6. Una vez que la mezcla se ha homogeneizado, se añade una enzima con actividad betaglucanasa. La enzima se adiciona a la mezcla en una concentración aproximada de 0,01 unidades de betaglucanasa fúngica por kilogramo de materia prima de cacao. El tiempo de reacción de la enzima es de 1 a 3 horas y está inversamente relacionado con la cantidad de enzima añadida. Así, a más cantidad de enzima adicionada, el tiempo de reacción será menor. Un exceso, o una disminución excesiva de la agitación, puede perjudicar a la reacción. Por lo tanto, se debe graduar la velocidad de agitación para que la reacción se desarrolle en las mejores condiciones. Es

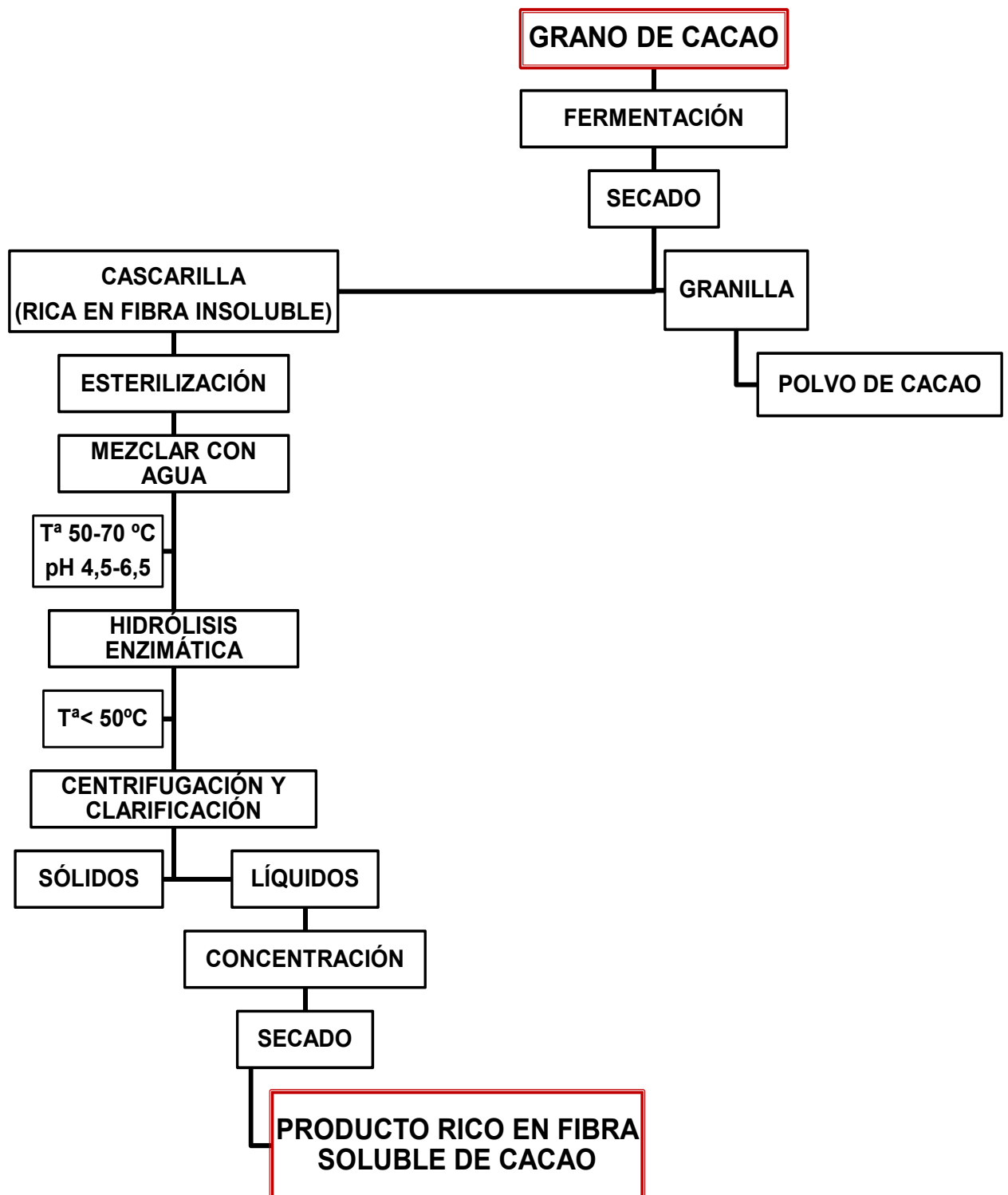
preferible inactivar la enzima después de concluir la reacción enzimática. Esta inactivación se puede realizar al concluir la hidrólisis o en una etapa posterior a la producción.

Después de la hidrólisis enzimática, la mezcla sufre procesos de centrifugación que tienen como finalidad separar la fracción soluble. Los sólidos totales se definen como la suma de los sólidos en suspensión y los sólidos solubles. Los sólidos solubles se definen tecnológicamente como aquellas partículas con un tamaño menor a 5  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, para obtener un producto soluble, se deben separar todas las partículas en suspensión mayores a 5  $\mu\text{m}$ . La operación de separación puede realizarse en realidad en dos etapas: una etapa de centrifugación y una etapa opcional de clarificación. En la etapa de centrifugación se separan todos los sólidos mayores a 20  $\mu\text{m}$ , y en la etapa de clarificación se separan los sólidos remanentes en suspensión mayores de 5  $\mu\text{m}$ . En el proceso de centrifugación se pueden utilizar decantadores industriales. Antes de la separación inicial, se recomienda enfriar la mezcla por debajo de 55 °C. A continuación, la mezcla fría se centrifuga para obtener una fase sólida y una fase líquida. La fase sólida se desecha. La fase líquida resultante después de las operaciones de centrifugación tiene un contenido de sólidos totales comprendidos entre el 1% y el 5%. Esta fase líquida se concentra hasta alcanzar un porcentaje de sólidos totales superior al 10%. Para esta operación se utilizan concentradores de fases simples, dobles o triples, a una temperatura comprendida entre 60 °C y 100 °C, y el proceso de concentración se realiza preferiblemente bajo vacío. A continuación, el concentrado pasa a una etapa de secado. El objetivo de esta etapa es obtener

un producto con un contenido de humedad inferior al 10%. El producto puede secarse utilizando un secador de spray, a temperaturas mayores a 75 °C. Si es necesario, se puede utilizar vacío durante la operación. Si se utiliza un secadero de spray, no es necesario molturar el producto. Sin embargo, si se utiliza otro sistema de secado, como por ejemplo secaderos de bandas, horizontales o verticales, es necesario aplicar una molienda final al producto. Estos secaderos pueden trabajar en condiciones normales o bajo vacío. En esta operación la enzima también se puede inactivar sometiendo el producto a temperaturas superiores a 90 °C durante 10 minutos.

Opcionalmente, la fase líquida obtenida después de la separación por centrifugación, puede sufrir un proceso de clarificación, en el que se pueden utilizar clarificadores verticales de platos. También es posible clarificar la fase líquida que sale del decantador utilizando sistemas de microfiltración.

Después de los procesos mencionados, se obtiene el producto utilizado en esta Tesis Doctoral al que hemos denominado PFSC. La figura 11 presenta un esquema del proceso de obtención de este producto. Su composición nutricional se describe en la tabla 6, y la tabla 7 señala la cantidad de polifenoles y procianidinas que contiene PFSC, así como la capacidad antioxidante de este producto.



**Figura 11.** Esquema del proceso de obtención del producto rico en fibra soluble de cacao.

**Tabla 6.** Composición nutricional del producto rico en fibra soluble de cacao (g/100g de muestra).

Humedad	3,51
Fibra dietética total	46,50
Fibra soluble	42,80
Fibra insoluble	3,70
Grasa	1,40
Proteínas	13,10
Azúcares totales	1,91
Teobromina	3,40
Cafeína	0,19
Polifenoles	2,24

**Tabla 7.** Polifenoles totales (mg/g), procianidinas (mg/g) y capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) del producto rico en fibra soluble de cacao.

Polifenoles totales <sup>a</sup>	22,4 $\pm$ 1,4
Procianidinas totales <sup>b</sup>	0,320 $\pm$ 0,011
Epicatequina	0,100 $\pm$ 0,003
Catequina	0,088 $\pm$ 0,002
Procianidina B1	0,093 $\pm$ 0,002
Catequina	0,088 $\pm$ 0,002
Procianidina B2	0,039 $\pm$ 0,007
ORAC Total	569 $\pm$ 76
H-ORAC	552 $\pm$ 75,7
L-ORAC	17 $\pm$ 1,2

Valores expresados como la media  $\pm$  Desviación Estándar (n=3)

TE=equivalentes de Trolox

ORAC=Oxygen radical absorbance capacity=Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno.

H-ORAC=ORAC Hidrofílico

L-ORAC=ORAC Lipofílico.

a) Medidos por el método Folin-Ciocalteu

b) Medidos por HPLC

### **3.2. ADMINISTRACIÓN AGUDA DE DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

Para estos ensayos, se utilizaron 30 ratas SHR macho de 17-22 semanas de vida, y peso comprendido entre 300 y 350 g. Todos estos animales procedían de Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas se almacenaron en jaulas de cinco animales cada una, y se mantuvieron a una temperatura estable de 23 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y dieta estándar para ratas a libre disposición (A04 Panlab, Barcelona, España).

Para estos ensayos, se utilizaron asimismo diferentes productos (AHM, BETA-G, CHIT y PFSC), y se administraron diferentes dosis de cada uno a las ratas SHR. En el caso de AHM, BETA-G y CHIT, las dosis administradas fueron 200 mg/kg, 300 mg/kg o 400 mg/kg. En el caso de PFSC, se administraron estas dosis y además las dosis 100 mg/kg o 500 mg/kg, que eran respectivamente menor y mayor que las dosis ensayadas de las restantes fibras. Las cantidades mencionadas de los respectivos productos se administraban siempre en dosis única a las ratas, disueltas en 1 ml de agua, por vía intragástrica. Como control negativo (para establecer la variación circadiana de la presión arterial en las ratas), se utilizó un grupo de ratas SHR a las que se les administraba mediante sonda intragástrica 1 ml de agua. Como control positivo, se utilizó un grupo de ratas SHR a las que se les administraba por la misma vía 50 mg/kg de Captopril (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España), fármaco con reconocido efecto antihipertensivo.

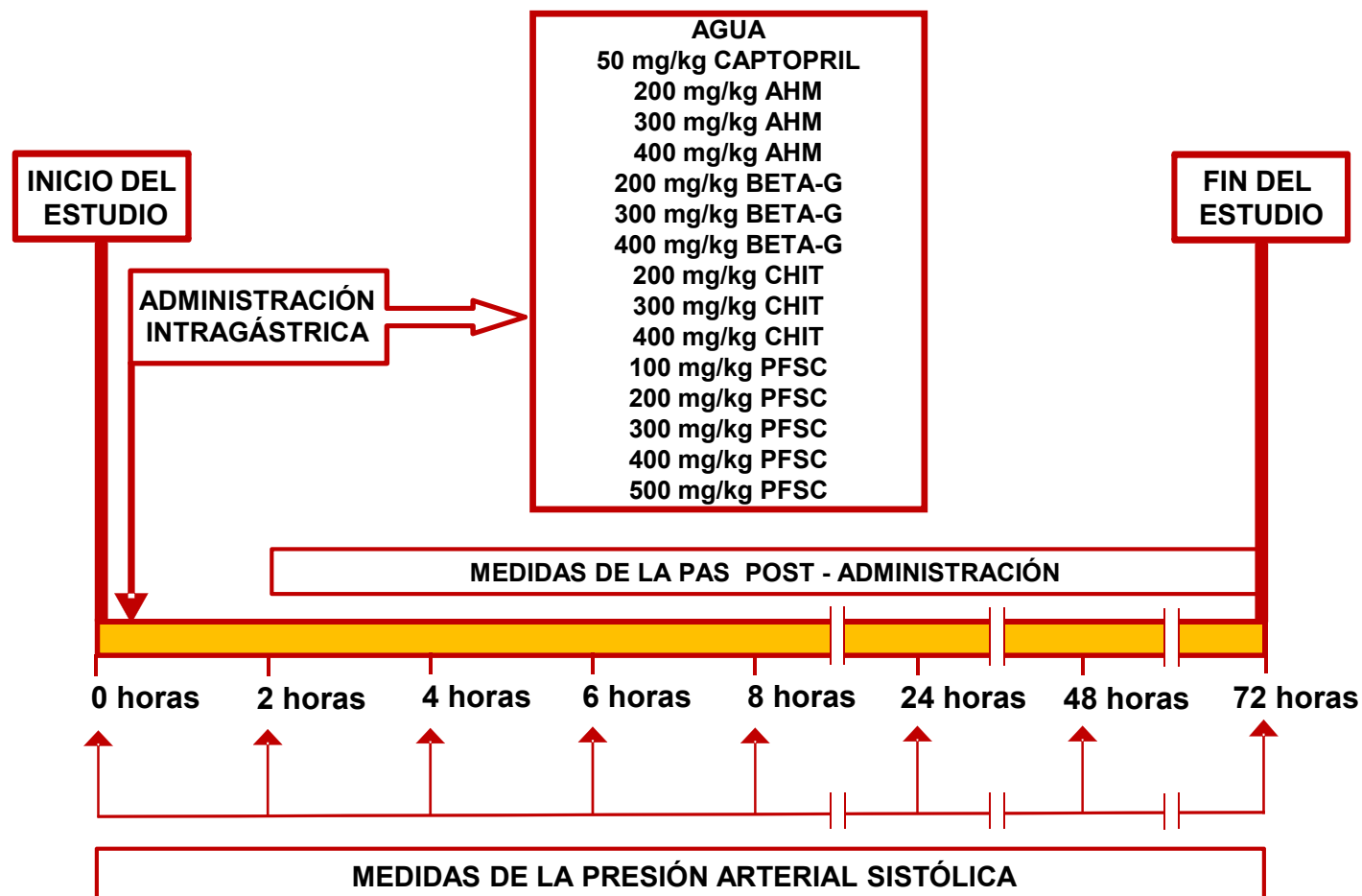
Las distintas administraciones se llevaban a cabo en un margen de tiempo comprendido entre las 9 y las 10 horas de la mañana. Antes de la administración correspondiente, se midió la PAS de las ratas por el método del manguito en la cola, descrito en el apartado 3.6.1, página 127, y después de la administración se realizaron nuevas medidas de la PAS en los animales periódicamente cada dos horas, hasta ocho horas post-administración. Adicionalmente, se tomaron medidas de la PAS 24, 48 y 72 horas después de la administración.

Se utilizó también un grupo de 8 ratas WKY macho de 17-22 semanas de vida, y peso comprendido entre 320 y 400 g, a las que administramos agua como control negativo o 300 mg/kg de PFSC. Estos animales tenían la misma procedencia que las ratas SHR y se mantuvieron en idénticas condiciones que aquellas. Los ensayos realizados en estas ratas normotensas fueron además semejantes a los descritos para las ratas hipertensas.

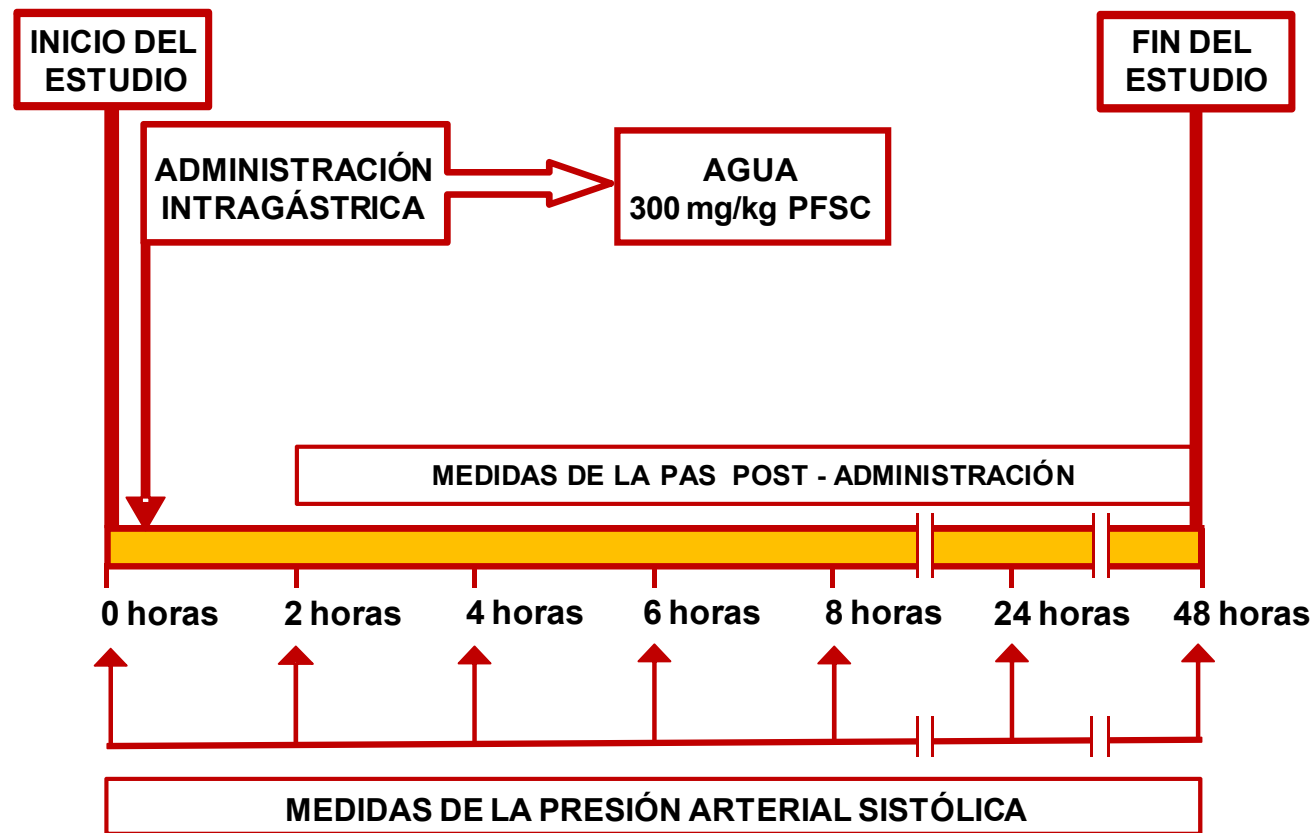
El número mínimo de ensayos homogéneos realizados para evaluar el efecto de una dosis de un producto fue ocho, y cada uno de estos ensayos se realizaba siempre en un animal distinto. Por otra parte, antes de llevar a cabo los ensayos anteriormente descritos, todas las ratas se acostumbraban, como mínimo, durante una semana, a la medida de la presión arterial y, además, después de administrar una dosis determinada de un producto, esperábamos siempre, como mínimo, cuatro días para realizar una nueva administración en el mismo animal. Para evitar posibles alteraciones en la medida de la presión arterial y garantizar un mayor rigor científico en los ensayos descritos, se utilizó

el método de doble ciego, de forma que el investigador sólo supo cuál era el producto y la dosis administrada después de haber medido la PAS en las ratas. Las figuras 12 y 13, páginas 112 y 113, son dos esquemas que muestran las distintas administraciones realizadas respectivamente en ratas SHR y ratas WKY para estos ensayos. Estas figuras también muestran el protocolo para las medidas de la presión arterial realizadas en estos animales.



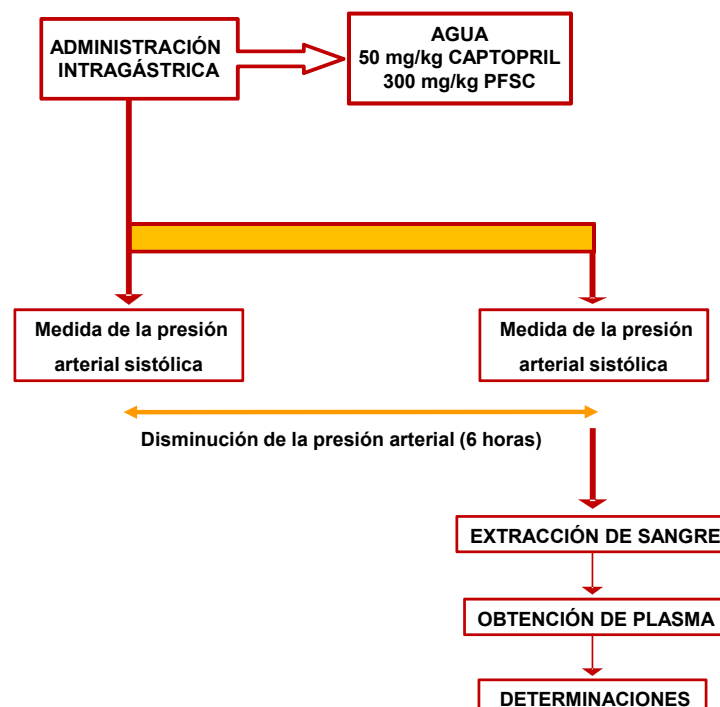


**Figura 12.** Protocolo experimental para evaluar el efecto de la administración aguda, sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas de agua (control negativo), Captopril (50 mg/kg) (control positivo) o diferentes dosis de los siguientes productos: almidón hi-maize 260 (AHM), beta glucan 0,75 mm (BETA-G), chitosan 95 (CHIT) y producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC).



**Figura 13.** Protocolo experimental para evaluar el efecto de la administración aguda sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas Wistar-Kyoto de agua (control negativo) o 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC).

Como complemento de los ensayos descritos anteriormente, llevamos a cabo experimentos adicionales con 8 ratas SHR macho tratadas por vía intragástrica con 300 mg/kg de PFSC (dosis de este producto que mostró mayor efecto sobre la presión arterial). En estos experimentos, se realizaba la medida de la presión arterial de las ratas SHR antes, y seis horas después de la administración intragástrica (momento de mayor disminución de la presión arterial), a continuación, extraíamos sangre a los animales de la vena yugular, según se describe en el apartado 3.6.2., página 128. Se llevaron a cabo ensayos semejantes con 8 ratas SHR que habían recibido 1 ml de agua por vía intragástrica (control negativo), y también con otro grupo de 8 ratas tratadas por esta vía con 50 mg/kg de Captopril (control positivo). La sangre de todos estos animales se utilizó para las determinaciones plasmáticas de la capacidad antioxidante total, de los niveles de MDA y de la actividad de la ECA. Todas estas determinaciones se realizaron según se describen en el apartado 3.6.5, 3.6.6, 3.6.9 respectivamente, de ésta Tesis Doctoral. La figura 14, página 115, muestra un esquema del protocolo experimental para la realización de los anteriores ensayos.



**Figura 14.** Esquema del protocolo experimental para la extracción de sangre en ratas espontáneamente hipertensas, tratadas con agua (control negativo), 50 mg/kg Captopril (control positivo) o 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC).

### 3.3. ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

Para este estudio, se utilizaron ratas SHR macho, con 10 semanas de vida, procedentes de Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas se colocaron en jaulas de 4 animales, y se mantuvieron con una temperatura ambiental estable de 23 °C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y dieta sólida estándar para ratas a libre disposición (A04 Panlab, Barcelona, España).

Al comienzo del estudio, las ratas se dividieron en seis grupos homogéneos, cada uno compuesto por 8 animales (dos jaulas). Los animales de

los distintos grupos ingirieron a libre disposición, respectivamente, los siguientes productos líquidos hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento): agua (control negativo), una solución de Captopril que se ajustaba semanalmente para que las ratas ingiriesen 50 mg/kg/día de este fármaco (control positivo), una solución de BETA-G (fibra estándar) que se ajustaba semanalmente para que las ratas ingiriesen 800 mg/kg/día de esta fibra, o distintas soluciones de PFSC que se ajustaban semanalmente para que las ratas ingiriesen 200 mg/kg/día, 400 mg/kg/día o 800 mg/kg/día de este producto. Se llevaron a cabo semanalmente medidas de la PAS en los seis grupos de ratas a partir de las 11 semanas de vida. Para estas medidas, se utilizó la técnica del manguito en la cola, descrita en el apartado 3.6.1, página 127. Las medidas se obtuvieron siempre entre las 9 horas y las 13 horas del día. Desde el comienzo del estudio, cuando las ratas tenían 10 semanas de vida, se controló también semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de los animales. El ajuste semanal de las soluciones se realizaba teniendo en cuenta el peso corporal de los animales y el volumen de líquido ingerido la semana anterior.

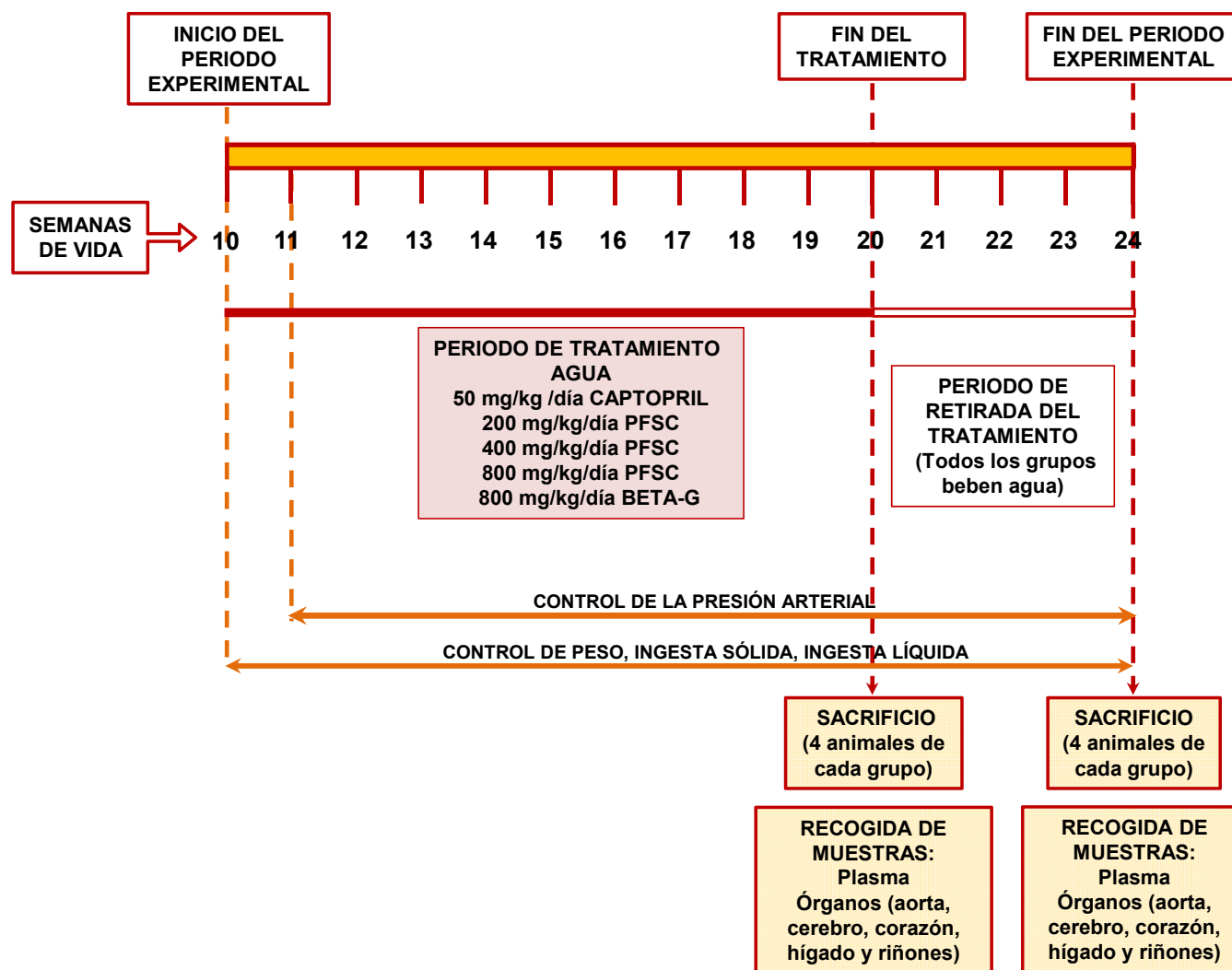
La mitad de los animales de cada grupo (4 ratas) se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg de Ketolar 50 mg/ml, i.p.) y Xilacina (12 mg/kg de Rompun 2%, i.p.) (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España), al final del tratamiento, y se sacrificaron a continuación por decapitación con guillotina para extraer sangre y distintos órganos (aorta, cerebro, corazón, hígado y riñones). Los restantes animales (4 ratas de cada grupo) ingirieron agua desde las 20 semanas de vida hasta que tenían 24 semanas de vida (periodo de retirada del tratamiento) y durante este tiempo se siguieron realizando medidas semanales de la presión arterial en las ratas de los distintos grupos y se siguió controlando semanalmente

el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de estos animales. Cuando estos animales tuvieron 24 semanas de vida, se sacrificaron por el procedimiento descrito anteriormente y se procedió con ellos igual que con los animales sacrificados al finalizar el período del tratamiento.

La sangre obtenida de las ratas sacrificadas se utilizó para llevar a cabo determinaciones plasmáticas de glucosa, colesterol total, triglicéridos, capacidad antioxidante total, MDA, actividad de la ECA y actividad de la eNOS, cabe señalar que ésta última determinación se realizó en el plasma de las ratas SHR tratadas con 400 mg/kg/día de PFSC y en el plasma de los animales que habían ingerido agua a lo largo del período de tratamiento. Las muestras de plasma permanecieron congeladas a -80 °C hasta las correspondientes determinaciones.

Los órganos de los animales sacrificados se congelaron inmediatamente después de su extracción en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El tejido hepático congelado se utilizó para realizar las determinaciones de MDA y GSH que se incluyen en esta Tesis Doctoral. Los restantes órganos de los animales sacrificados permanecen almacenados a -80 °C para llevar a cabo posibles futuras determinaciones, que no se incluyen como parte experimental de esta Tesis Doctoral.

La metodología para todas las determinaciones mencionadas (plasmáticas y en tejido hepático) se realizaron según se describe en el apartado 3.6. A continuación, se muestra un esquema del protocolo experimental para la realización de los ensayos descritos en este apartado.



**Figura 15.** Protocolo experimental para evaluar el efecto de la administración crónica, sobre la presión arterial sistólica de ratas espontáneamente hipertensas.

### **3.4. ENSAYOS EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS**

Los anillos de aorta de las ratas SHR se montaron en baños de órganos tradicionales tal y cómo se describe en el apartado 3.6.10., página 137. Una vez montados los anillos se sometieron a una tensión inicial de 2,5 g. Durante el período de estabilización del tejido, se realizaron varios lavados con solución de Krebs-Henseleit cada 15 minutos, hasta que la tensión se estabilizó finalmente a 2,0 g.

A continuación se provocó la contracción de los anillos, exponiéndolos a una concentración 80 mM de KCl. Esta contracción permitió comprobar la funcionalidad arterial. Cuando se alcanzó la altura máxima de esta contracción (aproximadamente 20-30 minutos después de la administración de KCl), las preparaciones se lavaron con solución Krebs-Henseleit, hasta que recuperaron la tensión basal inicial antes de la administración.

Posteriormente, los anillos se expusieron a una concentración  $10^{-5}$  M de Metoxamina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), y cuando la contracción provocada alcanzó la altura máxima, el tejido se expuso a una concentración  $10^{-3}$  M de Acetilcolina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) que provocó la relajación arterial, para comprobar si el endotelio de la preparación era funcional. Las preparaciones que presentaban una relajación mayor del 80% se consideraban preparaciones con el endotelio intacto, y las preparaciones con una relajación menor del 10% se consideraban



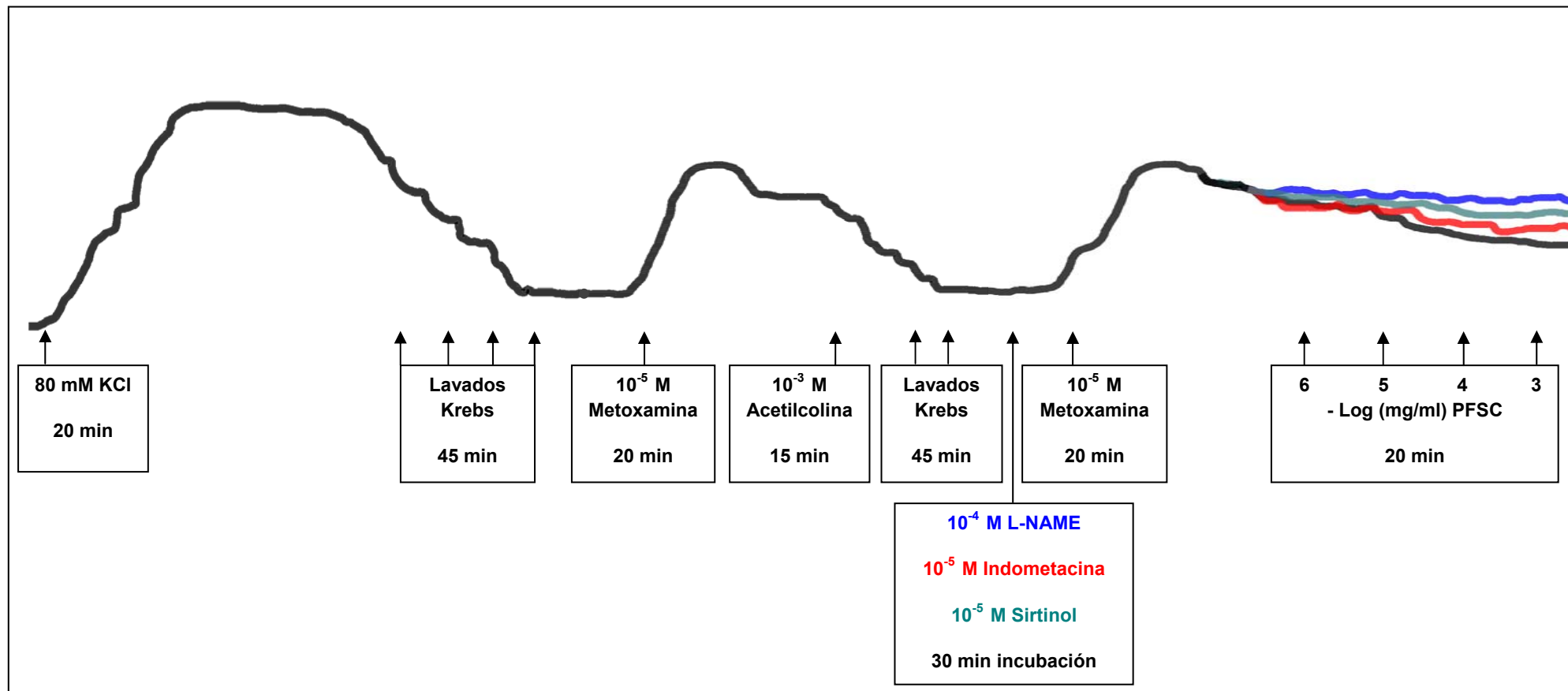
preparaciones sin endotelio. La eliminación del endotelio se realizó raspando suavemente la superficie interna del anillo de aorta con un vástago metálico. Así pues, las células endoteliales se eliminaron por acción mecánica. La utilización de estas preparaciones sin endotelio permitió dilucidar si la relajación producida por PFSC era endotelio dependiente o no.

Las preparaciones de anillos de aorta, se lavaban varias veces con solución Krebs-Henseleit después de haber provocado en ellas la relajación con Acetilcolina. A continuación, el tejido se exponía nuevamente a una concentración  $10^{-5}$  M de Metoxamina, y se provocaba así otra vez su contracción. Cuando esta contracción alcanzaba su altura máxima y se estabilizaba, el tejido se exponía a diferentes concentraciones crecientes y acumulativas de PFSC ( $10^{-6}$ - $10^{-3}$  mg/ml), y se obtenían así las curvas dosis-respuesta de PFSC en los anillos de aorta de las ratas SHR.

El protocolo anterior se llevó a cabo en diferentes tipos de preparaciones: preparaciones con el endotelio intacto, preparaciones desprovistas de endotelio, preparaciones con endotelio intacto incubadas con  $10^{-4}$  M de L-NAME (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (NO), preparaciones con endotelio intacto incubadas con  $10^{-5}$  M de Indometacina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), un inhibidor de la síntesis de Prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), preparaciones incubadas con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), y preparaciones incubadas con  $10^{-5}$  M de Sirtinol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) un inhibidor de la síntesis de

sirtuína-1 (SIRT-1) con un 10% DMSO. Los inhibidores, L-NAME, Indometacina y Sirtinol, se añadían a las preparaciones con el endotelio intacto después de llevar a cabo los lavados con solución de Krebs-Henseleit subsiguientes a la administración de Acetilcolina, y estos compuestos se mantenían en contacto con el tejido durante 30 minutos antes de provocar nuevamente la contracción con  $10^{-5}$  M de Metoxamina y administrar las diferentes dosis del PFSC ( $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  mg/ml).

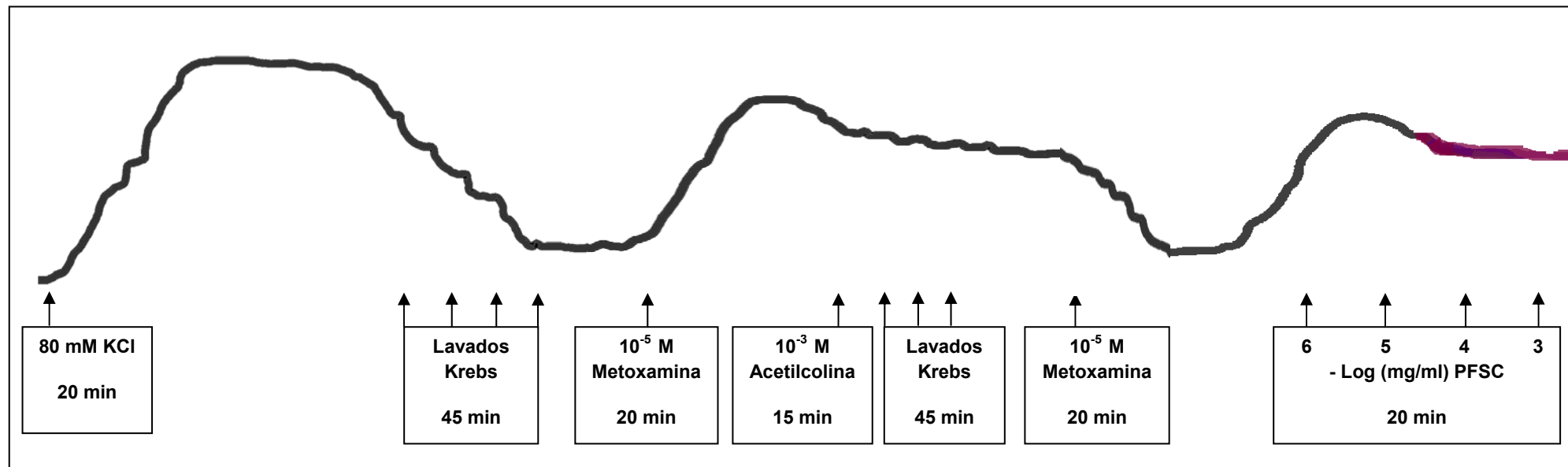
Se llevaron a cabo un mínimo de seis ensayos homogéneos, y cada uno de los anillos utilizados para estos ensayos procedía de un animal distinto. Las figuras 16 y 17, páginas 122 y 123, son dos esquemas que muestran respectivamente, el protocolo experimental para la realización de los ensayos descritos en este apartado.



PFSC=Producto rico en fibra soluble de cacao.

L-NAME= $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginina-metil-ester.

**Figura 16.** Esquema del protocolo para llevar a cabo los ensayos en preparaciones de anillos de aorta con endotelio de ratas espontáneamente hipertensas.



PFSC=Producto rico en fibra soluble de cacao.

**Figura 17.** Esquema del protocolo para llevar a cabo los ensayos en preparaciones de anillos de aorta sin endotelio de ratas espontáneamente hipertensas.

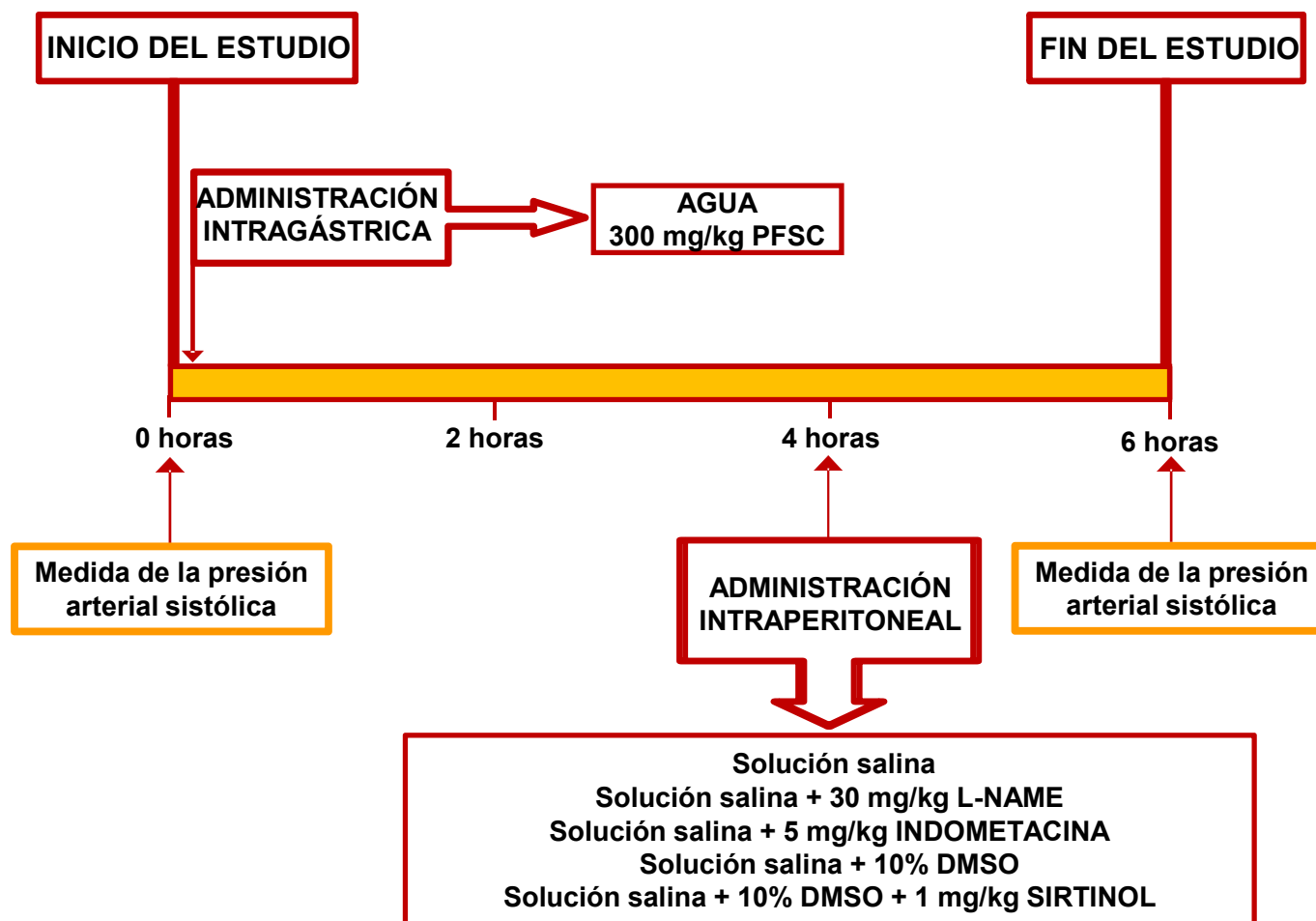
### **3.5. ENSAYOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS PARA ESTABLECER LA IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ENDOTELIALES VASODILADORES EN EL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO**

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron 50 ratas SHR macho de 17-22 semanas de vida, y peso comprendido entre 300 y 350 g, procedentes de Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas se almacenaron en jaulas de 5 animales cada una, y se mantuvieron a una temperatura estable de 23 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y dieta estándar para ratas a libre disposición (A04 Panlab, España).

Al comienzo del estudio, las ratas SHR se dividieron en dos grupos de 25 animales. Se medía la PAS de las ratas a primera hora de la mañana y, para estas medidas, se utilizó la técnica del manguito en la cola, según se describe en el apartado 3.6.1., página 127. Posteriormente, a los dos grupos de ratas se les administraron por vía intragástrica, respectivamente, 1 ml de agua o 300 mg/kg del PFSC disueltos en 1 ml de agua. Esta dosis de PFSC es la que había mostrado mayor efecto antihipertensivo en las ratas SHR del estudio agudo descrito en el apartado 3.2. Cuatro horas después de la administración intragástrica, los dos grupos de 25 animales se dividieron en cinco subgrupos, compuestos por 5 animales cada uno, y se administró por vía intraperitoneal, respectivamente, a tres de estos subgrupos 1 ml de las siguientes soluciones: 30 mg/kg de L-NAME, 5 mg/kg de Indometacina o 1 mg/kg de Sirtinol. Los

inhibidores, L-NAME e Indometacina se disolvieron en 1 ml de solución salina, y el Sirtinol se disolvió en 1 ml de solución salina con un 10% de DMSO. Los otros dos subgrupos se utilizaron como grupos control y se les administró respectivamente por vía intraperitoneal 1 ml de solución salina y 1 ml de solución salina con un 10% de DMSO.

Dos horas después de la administración intraperitoneal correspondiente (es decir, seis horas después de la administración intragástrica de agua o PFSC), se midió la PAS de cada animal, utilizando la técnica del manguito en la cola descrita en el apartado 3.6.1. La medida de la PAS se realizó en este momento porque en el estudio descrito anteriormente en el apartado 3.2. la mayor disminución de esta variable se observó seis horas después de administrar 300 mg/kg de PFSC. La figura 18, página 126, muestra un esquema del estudio descrito en este apartado.



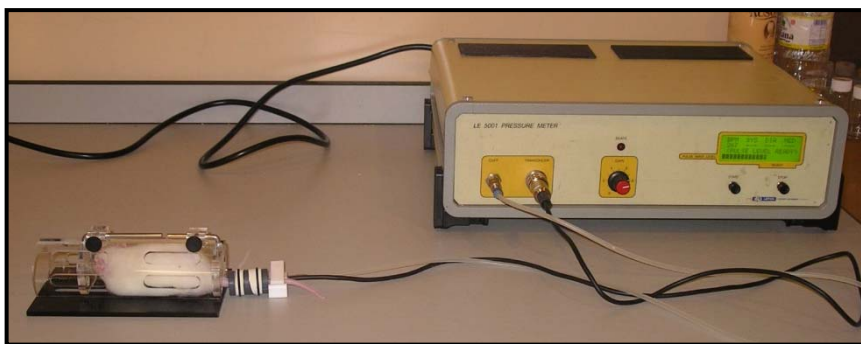
**Figura 18.** Protocolo experimental para evaluar la implicación de los factores endoteliales vasodilatadores en el efecto antihipertensivo del producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC).

### **3.6. TÉCNICAS UTILIZADAS**

#### **3.6.1. Medida de la presión arterial**

La medida de la PAS se llevó a cabo mediante una modificación de la técnica del manguito en la cola (tail cuff) (ver figura 19, página 128), originalmente descrita por Buñag (Buñag, 1973). La medida indirecta de la presión arterial con este método es básicamente como la medida que se lleva a cabo con un esfigmomanómetro, y el proceso es el mismo que el que se utiliza en humanos. Una vez que hemos conseguido una buena señal de pulso, la obtención de valores fiables de PAS solo depende de la agudeza del microprocesador para detectar cambios en el nivel de la onda de pulso. Los valores de la PAS, derivan del análisis de la amplitud de la onda de pulso. La PAS se alcanza cuando se detecta nuevamente la onda de pulso tras colapsar la arteria caudal. Antes de colocar el manguito y el transductor en la cola de las ratas, éstas se expusieron a una temperatura próxima a los 38 °C para facilitar la dilatación de la arteria caudal. Para obtener el valor de la PAS en cada momento, se realizaron como mínimo cinco medidas, y se obtuvo la media de todas ellas. Además, para asegurar la fiabilidad de la medida, los animales se acostumbraron al procedimiento al menos una semana antes de llevar a cabo el ensayo en cuestión.





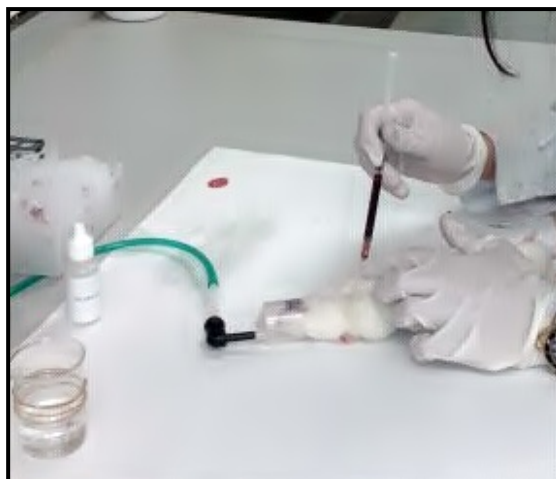
**Figura 19.** Técnica del manguito en la cola (Buñag, 1973)

### 3.6.2. Extracción de sangre

Las extracciones de sangre en la vena yugular de los animales se realizaron únicamente en los estudios en los que se administró PFSC de forma aguda.

Para ello, la rata se anestesió con Isoflurano (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España), mediante un equipo de anestesia con ventilación asistida. A continuación, se procedió a localizar el recorrido de la vena, y por último se perforó la piel con una jeringuilla previamente impregnada con heparina sódica al 5% (5000 UI/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (ver figura 20, página 129). Se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre de cada animal. Después de la extracción, se realizó una suave y firme presión sobre el lugar de la punción durante al menos 30 segundos, para evitar el sangrado. Una vez recuperado el animal de la anestesia se devuelve a su jaula.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos eppendorfs que contenían heparina sódica al 5% como anticoagulante, y se mantuvieron en hielo. A continuación, se centrifugó la sangre a 2500 g y 4 °C, durante 30 minutos. Así se obtuvo el plasma, que posteriormente se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.



**Figura 20.** Extracción de sangre

### **3.6.3. Homogeneización del tejido hepático y determinación de proteínas**

El hígado se extrajo del animal e inmediatamente se congeló y mantuvo a una temperatura de -80 °C hasta su posterior utilización. Se obtuvo un fragmento de 1 g aproximadamente del total del órgano, que se mezcló con 1 ml de solución de tampón fosfato (PBS) (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se trituró utilizando un homogeneizador Ultra turrax (Modelo T-50 Basic, Instrumentación Científico Técnica S.L., Madrid, España). El homogeneizado se mantuvo en hielo conservando la temperatura aproximadamente a 4 °C y posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C y a una velocidad de 5000 g. A continuación se recogió el sobrenadante,

qué se utilizó para la cuantificación de proteína y para determinar la cantidad de GSH y el MDA en este tejido.

- **Determinación de proteínas**

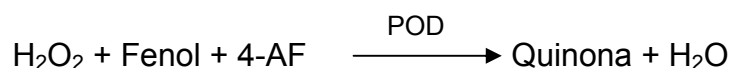
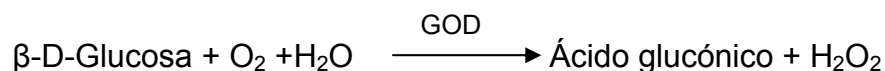
Para determinar el contenido de proteínas del sobrenadante obtenido tras la homogeneización del tejido hepático, se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita por Lowry (Lowry et al., 1951) con algunas modificaciones. Para ello, empleamos el ensayo diagnóstico de Biorad (DC protein assay, Biorad, USA). En una placa multipocillos se añadieron 20  $\mu$ l de la muestra diluida, y 20  $\mu$ l de la mezcla de los reactivos A (sustancia alcalina de tartrato sódico) y S (sustancia surfactante) en una proporción 1000:20, se añadió 160  $\mu$ l del reactivo B (fluorescente), y se incubó durante 15 minutos a 37 °C y en oscuridad. A continuación se midió la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro (Multiscan Ascent, España), tomando como referencia un blanco con 20  $\mu$ l de agua destilada. Se realizó una curva de calibrado con seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, USA) en concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10  $\mu$ g/ml.

### **3.6.4. Determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma**

Para la determinación de la glucosa, el colesterol total y los triglicéridos, se utilizaron kits comerciales adquiridos a Spinreact, S.A (Girona, España).

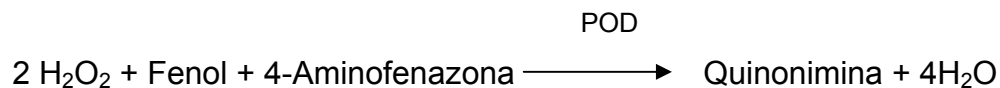
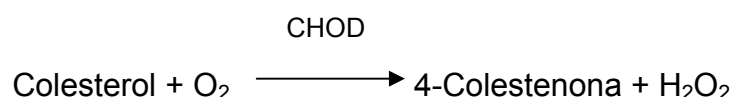
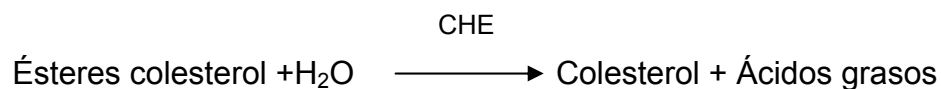
- La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido

glucónico. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD):



La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra de plasma. Los resultados se expresan como mg/dl de glucosa.

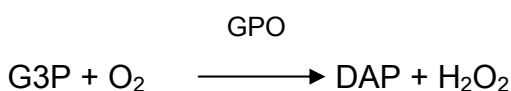
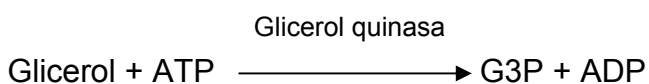
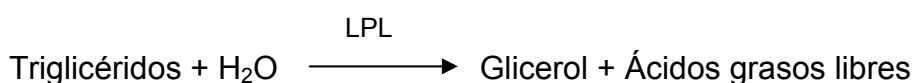
- El colesterol presente en la muestra de plasma, originó un compuesto coloreado debido a la reacción siguiente:



La intensidad del color es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra de plasma. Los resultados se expresan como mg/dl de colesterol.

- Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y

ácidos grasos libres. El glicerol se fosforila por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G<sub>3</sub>P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G<sub>3</sub>P se convierte a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por GPO. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con 4-aminofenazona y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa dando una coloración roja:



La intensidad del color es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de plasma. Los resultados se expresan como mg/dl de triglicéridos.

### 3.6.5. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma

Para determinar la capacidad antioxidante del plasma, se utilizó un ensayo que determina la actividad neutralizadora de radicales peroxilo (Oxygen radical absorbance capacity=Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno=ORAC). Se llevó a cabo según el método descrito por Dávalos y

colaboradores, en 2001, y por Ou y colaboradores, en 2001, y modificado por (Manso et al., 2008).

La mezcla final para realizar el ensayo fue de 200  $\mu$ l, que contenían, en el caso de la curva patrón 20  $\mu$ l de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) a diferentes concentraciones (1-8  $\mu$ M) , en el caso del blanco 20  $\mu$ l de solución de PBS (pH 7,4) y en el caso de las muestras 20  $\mu$ l de plasma. Se añadió a cada muestra anterior 120  $\mu$ l de fluoresceína disódica (70 nM) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 60  $\mu$ l de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (12 mM) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU). Todas las muestras, tanto la curva patrón, como el blanco y las diferentes muestras de plasma, se realizaron por triplicado. Las muestras y los patrones se disolvieron siempre en PBS. La fluoresceína disódica, que actuó como sustrato oxidable, se preparó en el mismo tampón y se almacenó en condiciones de oscuridad a 4 °C durante un máximo de 4 semanas. La 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida), productor de radicales de oxígeno, se preparó en PBS antes del análisis. El análisis se realizó en microplacas negras de 96 pocillos (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania), y la lectura se realizó en un lector de placas (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania) con un filtro de excitación de 490 nm y un filtro de emisión de 520 nm, a una temperatura de 37 °C, durante 97 minutos. Para el registro se utilizó el programa Fluorstar Control. Los valores ORAC se expresaron como equivalentes de trolox usando la curva patrón calculada en los ensayos. Los valores finales se expresan como  $\mu$ mol Trolox/ $\mu$ l plasma.

### **3.6.6. Determinación de malonildialdehído en plasma y tejido hepático**

Para determinar los niveles de malonildialdehído (MDA) en el plasma y en el tejido hepático de las ratas SHR se utilizó el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Rodríguez-Martínez & Torres, 1992) con ligeras modificaciones (Mendes et al., 2009; Fernández Vallinas et al., 2012). En primer lugar el plasma o el sobrenadante obtenido de la homogeneización del tejido hepático, se mantuvieron a 60 °C durante 30 minutos con NaOH 10 N (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en una proporción 1:10 (vol/vol). Posteriormente ambas muestras se mezclaron con ácido tricloroacético al 20% en 0,6 M HCl (1:1 vol/vol), y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos para precipitar los componentes de las distintas muestras, evitando así, posibles interferencias. Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos. A continuación, se añadió el TBA (120 mM en Tris 260 mM, pH=7) al sobrenadante en una proporción 1:5 (vol/vol), y la mezcla se calentó a 97 °C durante 30 minutos. La reacción entre MDA y TBA produce un pigmento estable de color rosa que es un aducto con un coeficiente de absorción molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el espectro visible (535 nm). Para la lectura de la absorbancia se utilizó un lector de placas HTS Multi-Modal de Microplacas Synergy NEO (BioTek, Distribuidor Izasa S.A. Alcobendas, Madrid). Las concentraciones de MDA se expresan como nmol de MDA/ml de plasma y como  $\mu\text{mol MDA}/\mu\text{g}$  proteína en tejido.

### **3.6.7. Determinación de glutatión reducido en tejido hepático**

Los niveles de glutatión reducido en el hígado se determinaron por el

método fluorimétrico monoclorobimane (Kamencic et al., 2000).

La mezcla final para realizar el ensayo fue de 100  $\mu$ l, que contenían, 90  $\mu$ l del sobrenadante de tejido hepático o de la curva patrón de glutatión reducido (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) en una solución PBS (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a diferentes concentraciones (0,001-10 mM) y 10  $\mu$ l de una solución que contenía glutatión S-transferasa (1 U/ml), obtenida de hígado de caballo (Sigma-Aldrich, USA), y monoclorobimane (Fluka Biochemical, Suiza) (1 mM). Todas las muestras tanto el patrón, como las diferentes muestras de sobrenadante se realizaron por duplicado. El análisis se realizó en microplacas negras de 96 pocillos (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania), la placa se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Durante este tiempo tiene lugar una reacción en la que el glutatión se une al monoclorobimane, generando un complejo fluorescente. Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a cuantificar la concentración del complejo, y por lo tanto de glutatión, mediante un fluorímetro (Multiskan Ascent, Labsystems, España). Los valores de glutatión reducido en hígado se expresan como  $\mu$ mol GSH/ $\mu$ g de proteína.

### **3.6.8. Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial en plasma**

La actividad de la eNOS se determinó únicamente en las muestras de plasma de las ratas que ingerían de forma crónica 400 mg/kg/día de PFSC o agua (control negativo). En estas muestras, se determinó la cantidad de eNOS



total y también la cantidad de eNOS fosforilada, y se expresó la actividad de esta enzima como la relación entre eNOS fosforilada y eNOS total. Para estas determinaciones, se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay=ELISA), que se realizaron con kits comerciales.

Para determinar la cantidad de eNOS total se utilizó el kit comercial Enzyme Liked ImmunoSorbent Assay kit for Nitric Oxide Synthase 3 (Life Science Inc., Wuhan, China) y para determinar la eNOS fosforilada se utilizó el kit comercial PathScan Phospho.eNOS Sandwich ELISA kit (Cell Signaling, Massachusetts, USA). En ambos casos, se midió la absorbancia de las placas multipocillo a 450 nm, y se utilizó para ello un lector de placas HTS Multi-Modal de Microplacas Synergy NEO (BioTek, Distribuidor Izasa S.A. Alcobendas, Madrid). Los resultados se mostraron como la relación entre el valor de la absorbancia a 450 nm obtenido al cuantificar la eNOS fosforilada y el valor de la absorbancia a 450 nm obtenido al cuantificar la eNOS total.

### **3.6.9. Determinación de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma**

El procedimiento que utilizamos para medir la actividad de la ECA está basado en el método de Friendland y Silverstein, (Friedland y Silverstein 1976), modificado por (Miguel et al., 2007) según se explica a continuación.

Una muestra de 3 µl se incubó durante 15 minutos a 37 °C por triplicado con 40 µl de tampón borato-HHL, que contenía una concentración 5 mM del

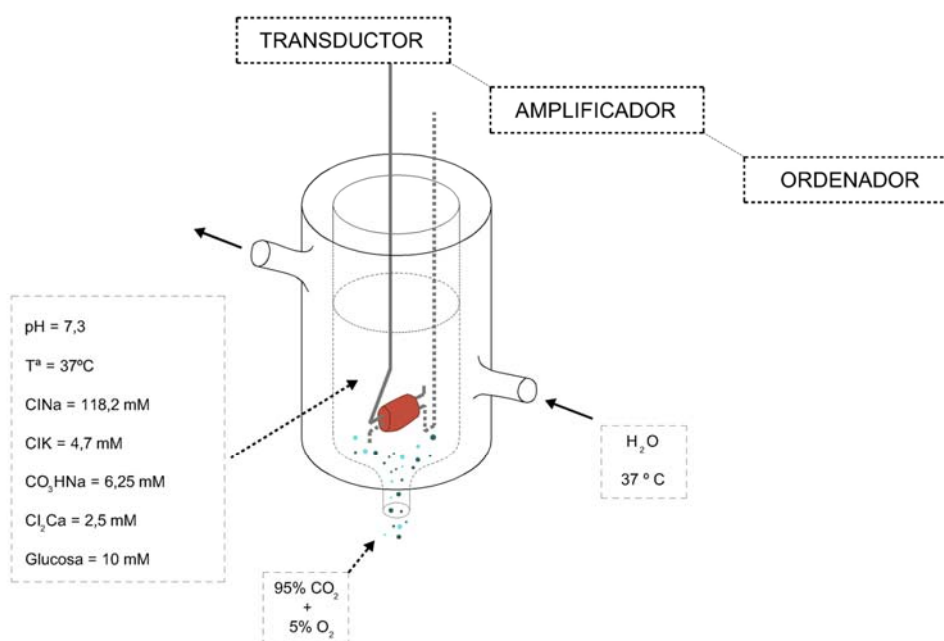
sustrato sintético de la ECA (Hip-His-Leu) (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España). La reacción se detuvo añadiendo 190  $\mu$ l de NaOH 0,35 M. El producto generado (His-Leu), se midió fluorimétricamente después de 10 minutos de incubación con 17  $\mu$ l de una solución de o-ftaldialdehído (OPA) al 2% en metanol (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España). Se usaron microplacas negras de poliestireno con 96 pocillos (Biogen Científica, Madrid, España). La curva de calibrado se hizo usando ECA de pulmón de conejo (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España). Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C en un lector de placas Fluostar Optima (BMG Labtech, GmbH, Offenburg, Alemania), a una longitud de onda de 350 nm de excitación y de 520 nm de emisión. Los resultados se expresan como mU ECA/ml plasma.

#### **3.6.10. Preparaciones de anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas en baños de órganos**

Para la realización de éstos ensayos se utilizaron ratas SHR macho de 20-25 semanas de vida. Una vez sacrificados los animales se extrajo la aorta torácica, y se depositó el tejido en un recipiente con solución Krebs-Henseleit que tenía la siguiente composición (mM): NaCl (118,2); KCl (4,7);  $\text{CaCl}_2$  (2,5);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,2);  $\text{MgSO}_4$  (1,2);  $\text{NaHCO}_3$  (25); y glucosa (10); pH=7,3. La arteria se limpió de tejido graso y conectivo, y se cortó en anillos de 3-4 mm de ancho. La arteria y los correspondientes anillos se mantuvieron siempre en solución de Krebs-Henseleit burbujeada con gas carbógeno (95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ ). Los anillos de aorta se montaron en baños de órganos tradicionales de 10 ml, burbujeados con gas carbógeno, que contenían también solución de Krebs-Henseleit. Ésta solución se mantenía a 37 °C. Para montar los anillos, estos se

## MATERIAL Y MÉTODOS

situaron entre dos ganchos de acero inoxidable con forma de U. El gancho inferior se colocaba en posición invertida después de haberlo introducido por la luz del anillo y se fijaba en la parte inferior del baño de órganos. El gancho superior se introducía también por la luz del anillo y se desplazaba para dar tensión a la preparación. Este gancho estaba acoplado a un transductor de fuerza isométrico de la casa comercial Panlab (Dynamometer UF1, España), que a su vez estaba acoplado a un amplificador de la misma casa (Ampo 16/2, España). Este amplificador enviaba la señal hasta el equipo informático, a través de una interfaz de la casa comercial Letica (Interface LE 60-100L/H, EEUU) a un programa informático (eDAQ Chart versión 5.2, Panlab, España) que permite obtener medidas digitales de la contracción o relajación, así como la visualización de las mismas a través de la pantalla del ordenador y su registro mediante impresora (ver figura 21).



**Figura 21.** Esquema del ensayo con anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas en baños de órganos.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos con los animales o sus muestras biológicas (plasma, aorta o tejido hepático), se expresaron cómo la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM) para un mínimo de 4 ensayos homogéneos.

Los datos obtenidos se analizaron por medio de un análisis de varianza, mediante ANOVA de una o dos vías, seguido del test de Bonferroni. Cuando resultó procedente, los resultados obtenidos en los distintos grupos de animales, se analizaron mediante el test de la t de Student para datos no apareados. Se consideró siempre significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$



## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS TRATADAS DE FORMA AGUDA CON DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en las que se evaluó el efecto de la administración aguda de distintas fibras, tenían unos valores basales de la presión arterial sistólica (PAS) a primera hora de la mañana de  $211,1 \pm 2,7$  mm Hg ( $n=30$ ). En las ratas SHR a las que administrábamos agua (control negativo), la PAS mantuvo valores semejantes al anterior durante las 24 horas en las que medíamos esta variable. Por el contrario, la administración de 50 mg/kg de Captopril (control positivo) ocasionó una disminución acusada de la PAS en las ratas SHR, que fue máxima 6 horas después de administrar este fármaco  $-43,5 \pm 5,0$  mm Hg ( $n=10$ ).

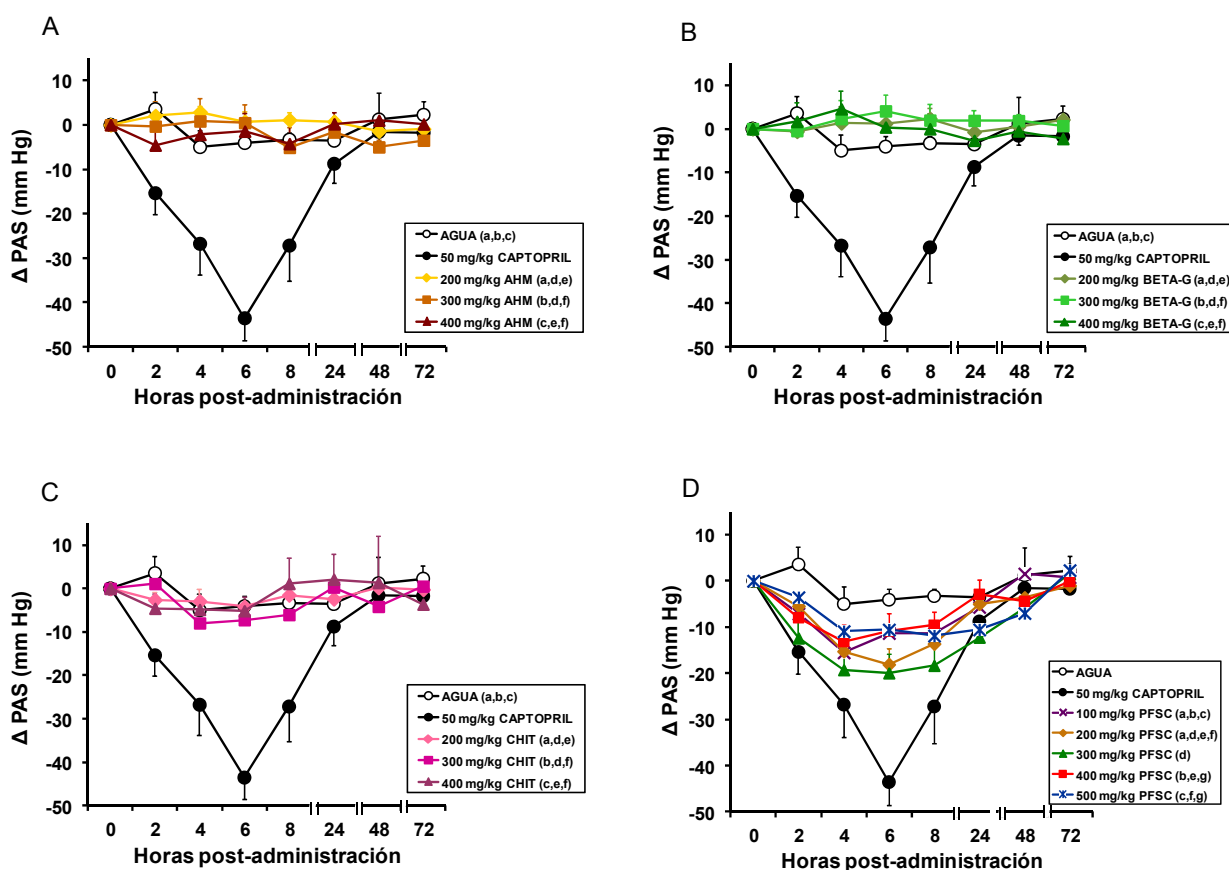
La administración de almidón hi-maize 260 (AHM), beta glucan 0,75 mm (BETA-G) y chitosan 95 (CHIT), en las distintas dosis utilizadas (200 mg/kg, 300 mg/kg y 400 mg/kg), no modificó la PAS de las ratas SHR (ver figura 22A, 22B y 22C). Sin embargo, cuando se administraron estas mismas dosis del producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) a las ratas SHR, observamos un descenso significativo de la PAS en los animales y 300 mg/kg de PFSC fue la dosis más eficaz. La máxima disminución de esta variable se observaba siempre entre 4 y 8 horas después de la administración de 300 mg/kg de PFSC, resultando muy semejantes los valores de la PAS en ese margen de



## RESULTADOS

tiempo. De hecho, las disminuciones de la PAS observadas 4, 6 y 8 horas después de la administración de 300 mg/kg de PFSC fueron muy similares ( $-19,3 \pm 3,8$  mm Hg,  $-19,9 \pm 4,0$  mm Hg y  $-18,4 \pm 3,8$  mm Hg, respectivamente). Pudimos apreciar también un descenso significativo de la PAS en las ratas SHR después de la administración de 100 mg/kg de PFSC o de 500 mg/kg de PFSC ( $-15,6 \pm 3,4$  mm Hg y  $-11,9 \pm 6,0$  mm Hg, respectivamente), pero estas dosis de PFSC ocasionaron descensos menores que los producidos por 300 mg/kg de este producto. En realidad, PFSC sólo ocasionó un efecto antihipertensivo dosis dependiente cuando se utilizaron dosis de este producto comprendidas entre 100 mg/kg y 300 mg/kg, pues el efecto de esta última dosis fue siempre mayor que el efecto de 400 mg/kg o 500 mg/kg de PFSC (ver figura 22D, página 145).

La disminución de la PAS causada por PFSC en las ratas SHR fue significativamente menor que la disminución de esta variable producida por 50 mg/kg de Captopril, pero el efecto producido en las ratas por la administración de 300 mg/kg de PFSC fue más duradero que el efecto observado en estos animales tras la administración del fármaco. De hecho, 48 horas después de administrar 300 mg/kg de PFSC, las ratas aún no habían recuperado los valores basales de PAS que tenían antes de la administración, pero, por el contrario, cuando se administraba Captopril se observaban valores de PAS semejantes a los valores basales después de este período de tiempo. Las ratas a las que se les administraban 300 mg/kg de PFSC, recuperaban 72 horas después los valores basales de PAS que tenían antes de la administración (ver figura 22D).



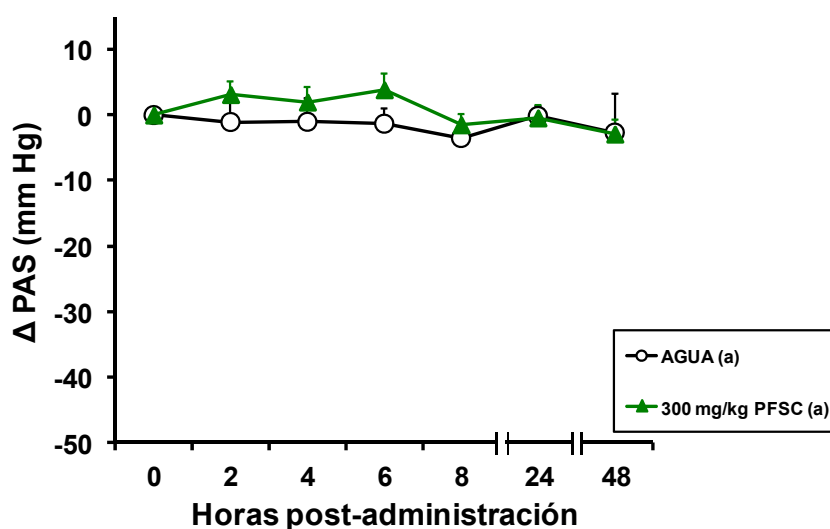
**Figura 22.** Disminuciones de la presión arterial sistólica (PAS) producidas en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de agua ( $\circ$ ), 50 mg/kg de Captopril ( $\bullet$ ) o diferentes dosis de distintos productos: almidón hi-maize 260 (AHM) [200 mg/kg ( $\diamond$ ), 300 mg/kg ( $\square$ ) y 400 mg/kg ( $\triangle$ )] (A), beta glucan 0,75 mm (BETA-G) [200 mg/kg ( $\diamond$ ), 300 mg/kg ( $\blacksquare$ ) y 400 mg/kg ( $\blacktriangle$ )] (B), chitosan 95 (CHIT) [200 mg/kg ( $\diamond$ ), 300 mg/kg ( $\blacksquare$ ) y 400 mg/kg ( $\blacktriangle$ )] (C) y producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) [100 mg/kg ( $\times$ ), 200 mg/kg ( $\diamond$ ), 300 mg/kg ( $\blacktriangle$ ), 400 mg/kg ( $\blacksquare$ ) y 500 mg/kg ( $\times$ )] (D). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

La tabla 8 (página 146) muestra los valores de la PAS que presentaban las ratas SHR antes y después de la administración de las diferentes dosis de PFSC.

**Tabla 8.** Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas en distintos momentos después de la administración de agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales

Horas post-administración	PAS (mm Hg)						
	AGUA (n=10)	CAPTOPRIL 50 mg/kg (n=10)	PFSC				
			100 mg/kg (n=8)	200 mg/kg (n=8)	300 mg/kg (n=8)	400 mg/kg (n=8)	500 mg/kg (n=8)
0	206,5 $\pm$ 2,7	207,5 $\pm$ 1,6	210,0 $\pm$ 2,0	211,3 $\pm$ 1,1	212,0 $\pm$ 3,1	211,5 $\pm$ 4,1	210,8 $\pm$ 2,8
2	210,5 $\pm$ 6,0	192,1 $\pm$ 6,4	202,8 $\pm$ 4,4	205,8 $\pm$ 3,4	199,6 $\pm$ 6,7	203,6 $\pm$ 7,0	207,2 $\pm$ 6,7
4	201,5 $\pm$ 6,3	180,7 $\pm$ 8,7	194,4 $\pm$ 5,4	195,7 $\pm$ 3,3	192,7 $\pm$ 6,9	198,4 $\pm$ 7,5	199,9 $\pm$ 7,9
6	202,4 $\pm$ 5,0	163,9 $\pm$ 6,7	198,7 $\pm$ 4,6	192,9 $\pm$ 4,5	192,0 $\pm$ 4,4	200,6 $\pm$ 7,8	200,2 $\pm$ 8,7
8	203,2 $\pm$ 4,1	163,9 $\pm$ 9,7	198,6 $\pm$ 5,1	197,4 $\pm$ 3,4	194,0 $\pm$ 6,9	201,9 $\pm$ 6,5	198,9 $\pm$ 8,8
24	202,9 $\pm$ 4,2	198,7 $\pm$ 5,9	204,3 $\pm$ 3,6	206,0 $\pm$ 3,8	199,7 $\pm$ 5,7	208,6 $\pm$ 7,1	200,2 $\pm$ 6,7
48	207,7 $\pm$ 8,6	205,9 $\pm$ 3,7	211,5 $\pm$ 3,8	207,9 $\pm$ 6,0	206,1 $\pm$ 7,5	207,0 $\pm$ 7,0	203,8 $\pm$ 6,4
72	208,7 $\pm$ 5,7	205,7 $\pm$ 2,6	210,8 $\pm$ 2,2	210,0 $\pm$ 3,5	213,5 $\pm$ 4,6	211,3 $\pm$ 6,9	213,1 $\pm$ 4,2

Los valores de la PAS de las ratas Wistar-Kyoto (WKY) a las que se administraban 300 mg/kg de PFSC no se modificaron significativamente a lo largo del período en el que se midió esta variable, y fueron muy semejantes a los valores de la PAS de las ratas WKY a las que se administraba agua (ver figura 23).



**Figura 23.** Modificación de la presión arterial sistólica (PAS) producida en ratas Wistar-Kyoto, tras la administración mediante sonda intragástrica de agua (○) o 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) (▲). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

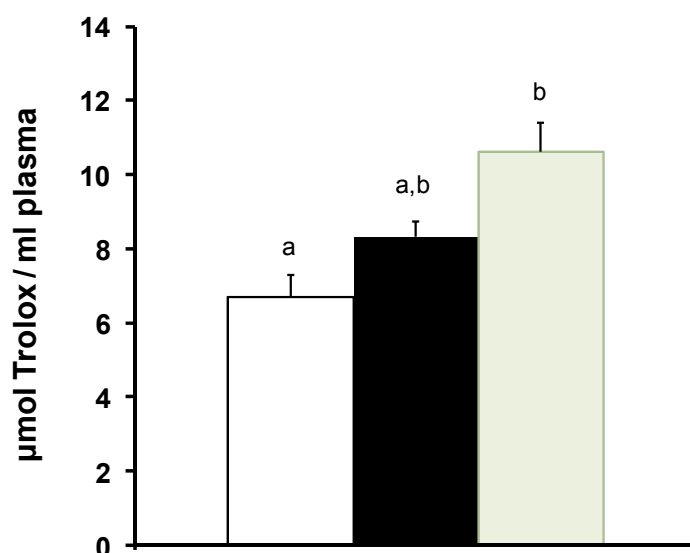
La tabla 9 (página 144) muestra los valores de la PAS que presentaban las ratas WKY antes y después de la administración de agua o 300 mg/kg de PFSC.

**Tabla 9.** Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas Wistar-Kyoto en distintos momentos después de la administración de agua, o 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales.

Horas post-administración	PAS (mm Hg)	
	AGUA (n=10)	300 mg/kg PFSC (n=8)
0	159,6 $\pm$ 2,1	150,0 $\pm$ 4,0
2	158,5 $\pm$ 3,9	153,1 $\pm$ 5,2
4	158,3 $\pm$ 3,9	151,9 $\pm$ 4,8
6	160,1 $\pm$ 3,9	153,8 $\pm$ 3,4
8	155,0 $\pm$ 4,3	148,5 $\pm$ 4,1
24	159,4 $\pm$ 2,3	149,6 $\pm$ 3,2
48	158,6 $\pm$ 3,6	147,0 $\pm$ 2,9

La capacidad antioxidante del plasma (Oxygen radical absorbance capacity=Capacidad para absorber radicales de oxígeno=ORAC) de las ratas SHR a las que habíamos administrado 50 mg/kg de Captopril mediante sonda intragástrica ( $8,30 \pm 0,40$   $\mu$ mol Trolox/ml plasma), fue semejante a la capacidad antioxidante del plasma de las ratas SHR a las habíamos administrado agua utilizando el mismo procedimiento ( $6,70 \pm 0,57$   $\mu$ mol Trolox/ml plasma). Sin embargo, cuando comparamos la capacidad antioxidante del plasma de este último grupo de ratas y la capacidad antioxidante del plasma de las ratas SHR a las habíamos administrado 300 mg/kg de PFSC mediante sonda intragástrica, pudimos comprobar que el plasma de los animales tratados de

forma aguda con 300 mg/kg de PFSC tenía una capacidad antioxidante significativamente mayor ( $10,60 \pm 0,80 \mu\text{l Trolox/ml plasma}$ ), que el plasma de las ratas del grupo control negativo (ver figura 24)

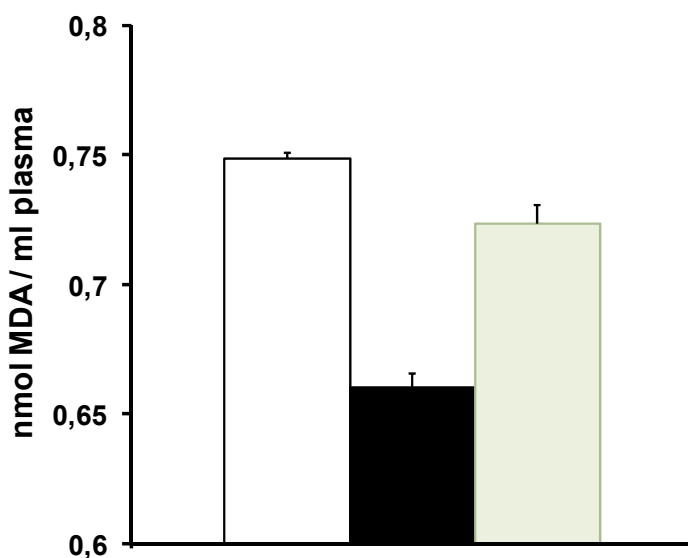


**Figura 24.** Histogramas de la capacidad antioxidante del plasma de ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración de diferentes productos: agua (□), 50 mg/kg Captopril (■) o 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (■). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Las ratas SHR a las que habíamos administrado 50 mg/kg de Captopril mediante sonda intragástrica, tenían menores niveles plasmáticos de MDA ( $0,66 \pm 0,0051 \text{ nmol MDA/ml plasma}$ ) que las ratas SHR tratadas por esta vía con 300 mg/kg de PFSC ( $0,72 \pm 0,0069 \text{ nmol MDA/ml plasma}$ ), y estos animales presentaban menores concentraciones plasmáticas de este metabolito que las ratas SHR del grupo control negativo a las que habíamos

## RESULTADOS

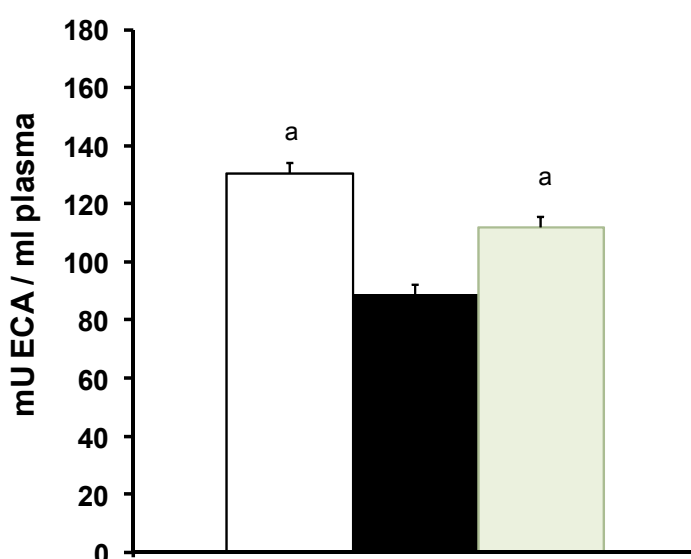
administrado agua mediante una sonda por vía intragástrica ( $0,74 \pm 0,0038$  nmol MDA/ml plasma) (ver figura 25).



**Figura 25.** Histogramas de la concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) en ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración de diferentes productos: agua (□), 50 mg/kg Captopril (■) o 300 mg/kg producto rico en fibra soluble de cacao (■). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Se observaron diferencias significativas entre todos los grupos.

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el plasma de las ratas SHR a las que habíamos administrado 50 mg/kg de Captopril mediante sonda intragástrica ( $89,02 \pm 3,15$  mU ECA/ml plasma), fue menor que la actividad de la ECA en el plasma de los restantes animales. Sin embargo, la actividad de esta enzima en el plasma de los animales tratados con 300 mg/kg de PFSC por el mismo procedimiento, fue sólo ligeramente inferior ( $118,00 \pm 4,10$  mU ECA/ml plasma) que la actividad de la misma en el plasma de las ratas del grupo control negativo, a las que habíamos

administrado agua por vía intragástrica ( $130,31 \pm 3,80$  mU ECA/ml plasma). No pudimos observar, en realidad, diferencias significativas al comparar la actividad de la ECA en el plasma de estos dos últimos grupos de ratas (ver figura 26).



**Figura 26.** Histogramas de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el plasma de ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración de diferentes productos: agua (□), 50 mg/kg Captopril (■) o 300 mg/kg producto rico en fibra soluble de cacao (■). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.



#### **4.2. RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS TRATADAS CRONICAMENTE CON EL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO**

Las ratas SHR que ingerían diariamente agua, mostraron un incremento progresivo de la presión arterial desde que tenían 10 semanas de vida hasta que tenían aproximadamente 19-20 semanas de vida. A partir de este momento, la PAS de estos animales se mantuvo alta, pero estable, hasta la semana 24 de vida. Las ratas que recibían tratamiento diario con 200 mg/kg de PFSC, con 800 mg/kg de PFSC o con 800 mg/kg de BETA-G mostraron valores de PAS muy semejantes a los de las ratas que bebían únicamente agua (grupo control negativo). Estos animales también mostraron valores de PAS semejantes a los del grupo control después de retirar estos tratamientos.

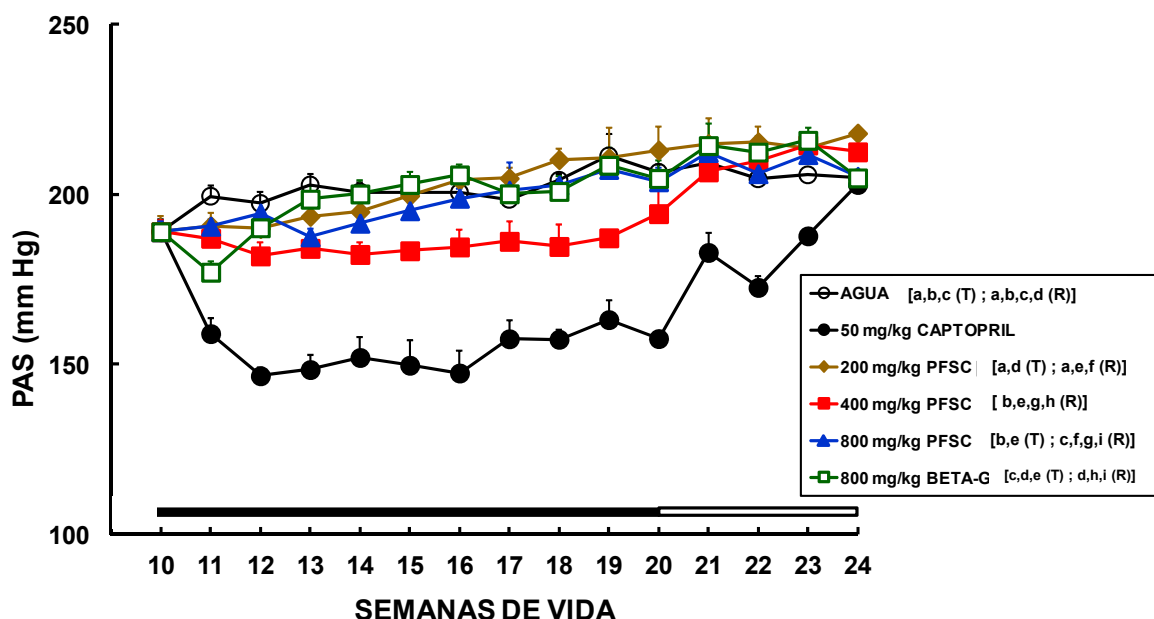
La PAS de las ratas SHR tratadas diariamente con 400 mg/kg de PFSC permaneció muy constante durante todo el período de tratamiento (desde la semana 10 a la semana 20 de vida) y, durante este período, la PAS de estos animales fue por lo tanto significativamente menor que la de las ratas que ingerían agua. También fue menor que la PAS de las ratas tratadas diariamente con otras dosis de PFSC o con 800 mg/kg de BETA-G. Los animales que se habían tratado diariamente con 400 mg/kg de PFSC aumentaron su PAS cuando se les retiró este tratamiento y, una semana después de suprimirlo, las ratas que habían dejado de ingerir la solución con esta dosis de este producto tenían ya valores de PAS semejantes a los de las ratas del grupo que había ingerido siempre agua.

Las ratas SHR que recibieron tratamiento diario con 50 mg/kg de Captopril (grupo control positivo) fueron las que presentaron menores niveles de PAS. Estos animales presentaron valores de PAS mucho menores que los de las ratas de los restantes grupos durante el periodo de tratamiento. La bajada más importante de la PAS en las ratas que bebían la solución de Captopril se produjo durante las dos primeras semanas de tratamiento, y esta variable permaneció después bastante estable hasta que las ratas SHR tuvieron 20 semanas de vida, momento en el que se retiró el tratamiento con el fármaco. La PAS de las ratas que se habían tratado con Captopril aumentó cuando los animales dejaron de ingerir el fármaco, pero la retirada del tratamiento no ocasionó una recuperación total de la PAS hasta que finalizó el estudio (cuando las ratas SHR tenían 24 semanas de vida) y, durante el período de tiempo comprendido entre la semana 20 y la semana 23 de vida, los valores de la PAS de las ratas que se habían tratado con el fármaco siguieron siendo menores que los valores de esta variable en las ratas de los restantes grupos. Es decir, la administración diaria de 50 mg/kg de Captopril ocasionó un efecto antihipertensivo muy marcado en las ratas SHR, y la dosis de 400 mg/kg/día de PFSC ocasionó también un efecto antihipertensivo en las ratas SHR, que se apreció claramente cuando se administraba diariamente esta dosis de este producto. Sin embargo, el efecto antihipertensivo de PFSC fue menor que el efecto antihipertensivo de Captopril, y los valores de la PAS en las ratas tratadas diariamente con 400 mg/kg de PFSC fueron más altos que los valores de PAS de las ratas tratadas diariamente con 50 mg/kg Captopril, existiendo diferencia significativa entre ambos tratamientos antihipertensivos. Por otra parte, la retirada del tratamiento con 400 mg/kg/día de PFSC ocasionó

## RESULTADOS

una recuperación rápida y total de la PAS en los animales, pero la retirada del tratamiento con Captopril ocasionó una recuperación de esta variable mucho más lenta, de forma que, en este caso, la recuperación total sólo se observó al finalizar el estudio cuando los animales llevaban 4 semanas sin ingerir el fármaco.

Los valores de presión arterial de los distintos grupos de ratas SHR, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 27, página 155, y aparecen en la tabla 10, página 156.



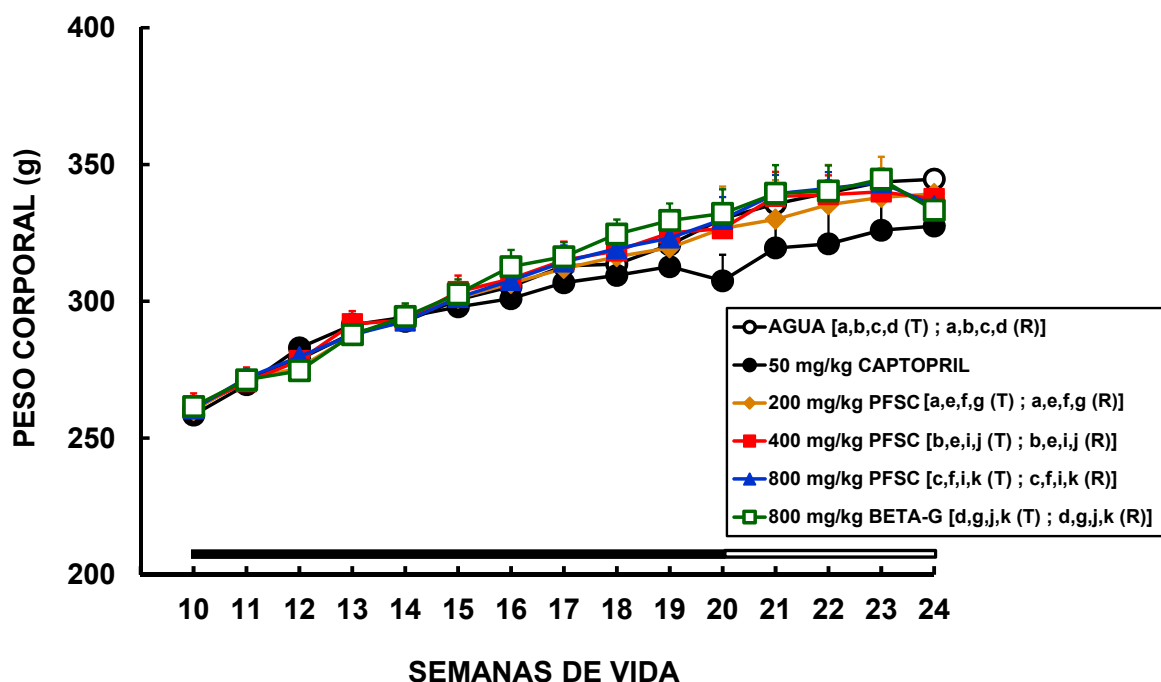
**Figura 27.** Presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 10 hasta la semana 20 de vida (periodo de tratamiento=T, representado por la barra sólida), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (●), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (◆), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (▲) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (□). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (periodo de retirada del tratamiento=R, representado por la barra vacía), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

**Tabla 10.** Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) semanales de ratas espontáneamente hipertensas durante la administración diaria de agua, 50 mg/kg de Captopril, diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para 8 animales hasta las 20 semanas de vida y para 4 animales entre las 20 y las 24 semanas de vida.

	PAS (mm Hg)					
Semanas de vida	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg	PFSC			BETA-G 800 mg/kg
			200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg	
10	188,9 ± 3,5	188,9 ± 3,6	188,9 ± 3,6	188,9 ± 3,6	188,9 ± 3,6	188,9 ± 3,5
11	199,3 ± 3,6	158,9 ± 6,9	191,7 ± 5,1	187,0 ± 4,2	190,5 ± 4,1	177,0 ± 1,7
12	197,2 ± 2,8	146,5 ± 3,7	189,8 ± 4,4	181,8 ± 3,2	194,4 ± 3,0	190,1 ± 3,2
13	202,6 ± 3,1	148,4 ± 4,5	193,4 ± 3,7	184,0 ± 4,0	187,4 ± 2,1	198,5 ± 2,7
14	200,6 ± 3,5	151,9 ± 2,4	194,8 ± 3,8	182,2 ± 3,9	191,4 ± 2,9	200,0 ± 4,1
15	200,5 ± 3,1	149,6 ± 4,3	199,5 ± 3,9	183,3 ± 3,7	195,1 ± 2,5	202,8 ± 3,9
16	200,4 ± 2,7	147,4 ± 6,1	204,2 ± 4,0	184,4 ± 3,6	198,8 ± 2,1	205,6 ± 3,7
17	198,4 ± 2,7	157,4 ± 7,3	204,7 ± 2,3	186,1 ± 1,7	201,1 ± 2,4	200,1 ± 3,2
18	204,7 ± 4,3	157,3 ± 6,6	210,1 ± 2,7	184,6 ± 4,9	202,6 ± 2,7	200,7 ± 3,8
19	211,2 ± 4,3	163,1 ± 5,4	210,7 ± 3,1	187,1 ± 5,9	207,2 ± 8,2	208,4 ± 4,4
20	206,4 ± 1,7	157,5 ± 2,8	212,9 ± 3,1	194,2 ± 6,6	203,6 ± 1,9	204,6 ± 5,1
21	209,2 ± 6,6	182,8 ± 5,6	214,8 ± 8,9	206,6 ± 0,4	212,2 ± 0,8	214,3 ± 5,3
22	204,5 ± 2,3	172,5 ± 1,5	215,3 ± 6,8	209,8 ± 7,8	206,0 ± 4,1	212,3 ± 6,3
23	205,6 ± 3,6	187,7 ± 5,8	213,5 ± 7,4	214,5 ± 6,8	211,6 ± 1,8	215,8 ± 4,7
24	204,7 ± 3,9	202,8 ± 3,4	217,9 ± 4,4	212,4 ± 4,7	205,3 ± 9,0	204,7 ± 3,7

El peso corporal de las ratas SHR aumentó progresivamente desde el comienzo del estudio hasta que este finalizó cuando los animales tenían 24 semanas de vida. El incremento en todos los grupos de ratas fue mucho más acentuado hasta que los animales tuvieron 15 semanas de vida y, hasta este momento, fue además muy semejante en las ratas de los distintos grupos. Sin embargo, desde que las ratas tenían 15 semanas de vida, las que se habían tratado diariamente con 50 mg/kg Captopril presentaron un incremento de peso corporal menos acentuado que los restantes grupos. Esta diferencia de pesos se mantuvo después de retirar los tratamientos en los distintos grupos (es decir, entre las ratas que se habían tratado con Captopril y las de los distintos grupos cuando los animales tenían edades comprendidas entre 20 y 24 semanas de vida), y fue significativa en todos los casos.

Los valores de peso corporal de los distintos grupos de ratas SHR, correspondientes a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 28, página 158, y aparecen en la tabla 11, página 159.



**Figura 28.** Peso corporal de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 10 hasta la semana 20 de vida (Periodo de tratamiento=T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (●), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (◆), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (▲) o una dosis de la fibra estándar beta glucan 0,75 mm (BETA-G) 800 mg/kg (□). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (periodo de retirada del tratamiento=R, representado por la barra vacía), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

**Tabla 11.** Valores del peso corporal en gramos (g) de ratas espontáneamente hipertensas en distintos momentos durante la administración diaria de agua, 50 mg/kg de Captopril, diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para 8 animales hasta las 20 semanas de vida y para 4 animales entre las 20 y las 24 semanas de vida.

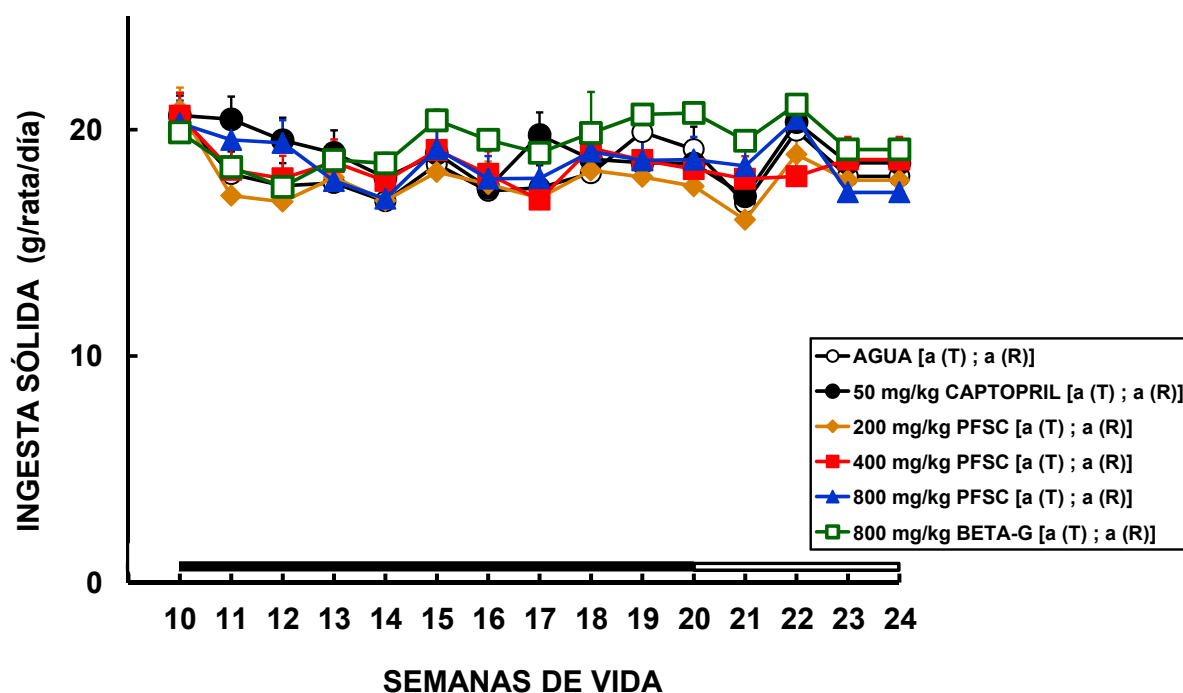
Semanas de vida	Peso corporal (g)					
	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg	PFSC			BETA-G 800 mg/kg
			200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg	
10	260,6 $\pm$ 3,9	258,4 $\pm$ 3,3	260,1 $\pm$ 3,7	261,3 $\pm$ 3,8	260,6 $\pm$ 2,0	261,5 $\pm$ 3,9
11	270,8 $\pm$ 3,7	269,5 $\pm$ 2,1	271,3 $\pm$ 3,4	270,5 $\pm$ 5,0	272,0 $\pm$ 2,9	271,6 $\pm$ 3,6
12	278,8 $\pm$ 3,1	283,0 $\pm$ 3,4	275,6 $\pm$ 3,0	278,3 $\pm$ 5,3	279,7 $\pm$ 3,1	274,6 $\pm$ 2,9
13	288,3 $\pm$ 2,7	291,4 $\pm$ 2,9	287,4 $\pm$ 3,5	291,7 $\pm$ 4,9	287,7 $\pm$ 3,7	287,7 $\pm$ 3,7
14	292,6 $\pm$ 3,8	294,2 $\pm$ 4,0	293,8 $\pm$ 4,2	293,1 $\pm$ 4,7	292,7 $\pm$ 3,7	294,4 $\pm$ 4,1
15	300,6 $\pm$ 2,9	298,0 $\pm$ 4,0	301,1 $\pm$ 3,8	303,5 $\pm$ 5,3	301,3 $\pm$ 4,1	302,7 $\pm$ 4,7
16	305,4 $\pm$ 2,2	301,0 $\pm$ 6,0	306,5 $\pm$ 5,3	308,1 $\pm$ 5,9	307,6 $\pm$ 4,9	312,6 $\pm$ 5,2
17	313,0 $\pm$ 4,3	306,8 $\pm$ 6,1	312,0 $\pm$ 5,2	315,0 $\pm$ 6,0	314,3 $\pm$ 5,0	316,3 $\pm$ 6,1
18	313,6 $\pm$ 5,6	309,5 $\pm$ 3,2	316,3 $\pm$ 5,1	318,4 $\pm$ 6,8	319,2 $\pm$ 6,0	324,6 $\pm$ 5,3
19	320,6 $\pm$ 3,7	312,6 $\pm$ 5,2	319,5 $\pm$ 5,6	325,0 $\pm$ 6,6	323,1 $\pm$ 6,0	329,5 $\pm$ 5,2
20	330,2 $\pm$ 3,8	307,5 $\pm$ 7,0	326,6 $\pm$ 5,3	326,6 $\pm$ 7,1	330,0 $\pm$ 5,5	332,1 $\pm$ 6,2
21	335,6 $\pm$ 3,3	319,5 $\pm$ 9,5	330,0 $\pm$ 15,3	338,3 $\pm$ 3,1	339,3 $\pm$ 8,1	339,5 $\pm$ 8,8
22	339,6 $\pm$ 4,1	321,0 $\pm$ 11,0	335,3 $\pm$ 14,2	339,0 $\pm$ 9,0	341,3 $\pm$ 6,8	340,3 $\pm$ 10,2
23	343,6 $\pm$ 4,6	326,0 $\pm$ 12,0	338,0 $\pm$ 14,5	340,0 $\pm$ 7,0	343,3 $\pm$ 5,9	344,6 $\pm$ 9,3
24	344,6 $\pm$ 4,9	327,5 $\pm$ 11,5	339,3 $\pm$ 14,8	337,5 $\pm$ 6,5	335,0 $\pm$ 13,0	333,3 $\pm$ 11,9



## RESULTADOS

El consumo de dieta sólida fue también muy semejante en los seis grupos de ratas SHR, presentando valores bastante estables en todos ellos a lo largo de todo el estudio.

Los datos de la ingesta sólida de los distintos grupos de ratas SHR, correspondientes a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 29, página 161, y aparecen en la tabla 12, página 162.



**Figura 29.** Ingesta sólida de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 10 hasta la semana 20 de vida (Periodo de tratamiento=T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (●), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (◆), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (▲) o una dosis de la fibra estándar beta glucan 0,75 mm (BETA-G) 800 mg/kg (□). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (periodo de retirada del tratamiento=R, representado por la barra vacía), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

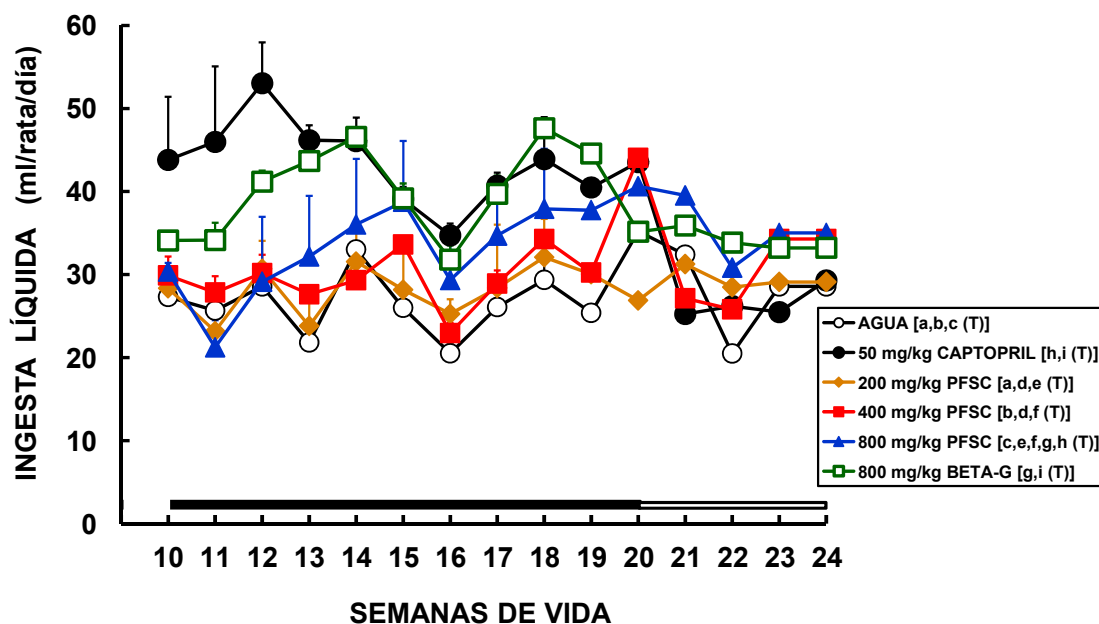
**Tabla 12.** Valores semanales de ingesta sólida de ratas espontáneamente hipertensas (g/rata/día), a las que se administraba diariamente agua, 50 mg/kg de Captopril, diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para 8 animales hasta las 20 semanas de vida y para 4 animales entre las 20 y las 24 semanas de vida.

Semanas de vida	Ingesta sólida (g/rata/día)					
	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg	PFSC			BETA-G 800 mg/kg
			200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg	
10	20,5 $\pm$ 0,2	20,6 $\pm$ 1,2	20,9 $\pm$ 0,1	20,6 $\pm$ 0,1	20,2 $\pm$ 0,0	19,8 $\pm$ 0,4
11	18,0 $\pm$ 0,1	20,4 $\pm$ 1,4	17,0 $\pm$ 0,6	18,2 $\pm$ 0,4	19,5 $\pm$ 1,9	18,3 $\pm$ 0,3
12	17,5 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 1,2	16,8 $\pm$ 0,0	17,8 $\pm$ 0,7	19,4 $\pm$ 2,6	17,4 $\pm$ 0,2
13	17,6 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,2	17,8 $\pm$ 0,6	18,5 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,8	18,6 $\pm$ 0,3
14	16,8 $\pm$ 0,4	17,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,0	17,7 $\pm$ 0,7	16,9 $\pm$ 0,4	18,5 $\pm$ 0,0
15	18,4 $\pm$ 0,3	18,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,1	19,1 $\pm$ 0,4	19,1 $\pm$ 0,7	20,4 $\pm$ 0,4
16	17,2 $\pm$ 0,4	17,4 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,0	18,0 $\pm$ 0,6	17,8 $\pm$ 0,7	19,5 $\pm$ 0,4
17	17,4 $\pm$ 1,0	19,7 $\pm$ 1,1	16,9 $\pm$ 0,0	16,9 $\pm$ 0,7	17,8 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,0
18	18,0 $\pm$ 0,3	18,7 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,4	19,0 $\pm$ 0,8	19,8 $\pm$ 0,0
19	19,8 $\pm$ 1,2	18,5 $\pm$ 0,0	17,9 $\pm$ 0,2	18,6 $\pm$ 0,2	18,6 $\pm$ 1,0	20,6 $\pm$ 1,8
20	19,1 $\pm$ 13,5	18,5 $\pm$ 13,0	17,5 $\pm$ 10,1	18,2 $\pm$ 12,9	18,6 $\pm$ 13,2	20,7 $\pm$ 14,6
21	16,7 $\pm$ 11,8	17,0 $\pm$ 12,0	16,0 $\pm$ 12,3	17,8 $\pm$ 12,6	18,3 $\pm$ 13,0	19,5 $\pm$ 13,7
22	19,9 $\pm$ 14,1	20,3 $\pm$ 14,3	18,9 $\pm$ 11,3	17,9 $\pm$ 12,6	20,4 $\pm$ 14,4	21,1 $\pm$ 14,9
23	17,9 $\pm$ 12,6	18,5 $\pm$ 13,1	17,7 $\pm$ 12,5	18,6 $\pm$ 13,2	17,2 $\pm$ 12,1	19,1 $\pm$ 13,5
24	17,9 $\pm$ 12,7	18,5 $\pm$ 13,1	17,7 $\pm$ 12,5	18,6 $\pm$ 13,2	17,2 $\pm$ 12,2	19,1 $\pm$ 13,5

Durante el período de tratamiento, la ingesta líquida de las ratas SHR de los distintos grupos fue siempre muy variable. Sin embargo, pudimos apreciar que la ingesta líquida era mayor en las ratas SHR tratadas diariamente con 50 mg/kg de Captopril o con 800 mg/kg de BETA-G que en los restantes grupos. La ingesta líquida de los animales tratados con 800 mg/kg de PFSC fue algo menor que la ingesta líquida de las ratas SHR tratadas diariamente con 50 mg/kg de Captopril o con 800 mg/kg de BETA-G, pero no se observó diferencia significativa en la ingesta líquida de estos tres grupos de ratas. Las ratas que ingerían agua o que recibían tratamiento con 200 mg/kg/día de PFSC o 400 mg/kg/día de PFSC presentaron una ingesta líquida menor que la de los grupos anteriores. No hubo diferencia significativa entre la ingesta líquida de los animales que ingerían agua y los que ingerían 200 mg/kg/día de PFSC o 400 mg/kg/día de PFSC.

A partir de la semana 20 de vida, en la que se retiraron los distintos tratamientos, se apreciaron diferencias significativas en la ingesta líquida de los distintos grupos de ratas, y cabe resaltar que las ratas que se habían tratado con Captopril fueron las que presentaron una mayor disminución en la ingesta líquida durante el período de retirada del tratamiento.

Los datos de ingesta líquida de los distintos grupos de ratas, correspondientes a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 30, página 164, y aparecen en la tabla 13, página 165.



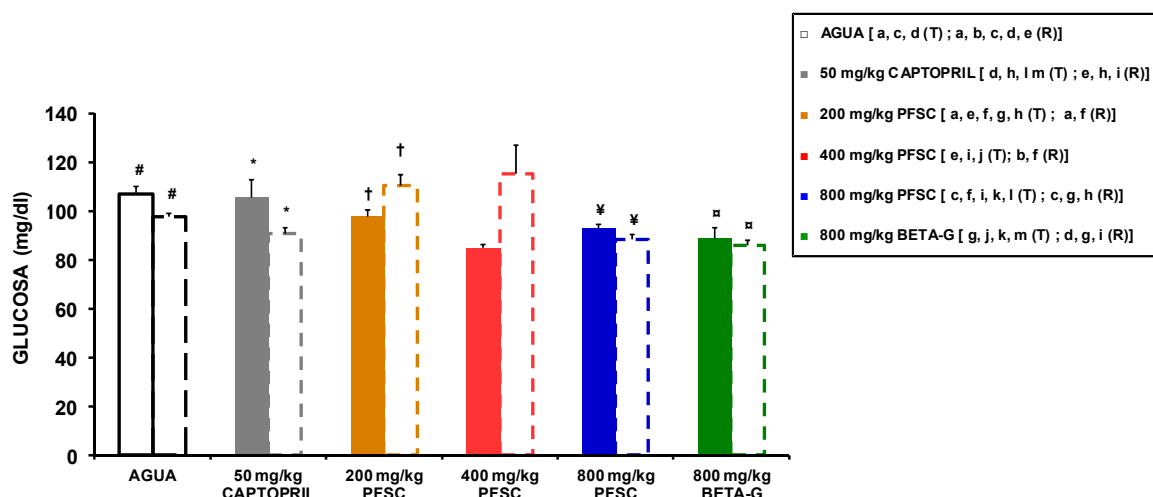
**Figura 30.** Ingesta líquida de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 10 hasta la semana 20 de vida (Periodo de tratamiento=T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (●), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (◆), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (▲) o una dosis de la fibra estándar beta glucan 0,75 mm (BETA-G) 800 mg/kg (□). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida todas (periodo de retirada del tratamiento=R, representado por la barra vacía), las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

**Tabla 13.** Valores semanales de ingesta líquida de ratas espontáneamente hipertensas (ml/rata/día), a las que se administraba diariamente agua, 50 mg/kg de Captopril, diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para 8 animales hasta las 20 semanas de vida y para 4 animales entre las 20 y las 24 semanas de vida.

Semanas de vida	Ingesta líquida (ml/rata/día)					
	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg	PFSC			BETA-G 800 mg/kg
			200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg	
10	27,2 $\pm$ 0,3	43,8 $\pm$ 4,5	28,3 $\pm$ 0,6	29,8 $\pm$ 0,4	30,3 $\pm$ 4,4	34,1 $\pm$ 1,6
11	25,6 $\pm$ 0,0	45,9 $\pm$ 7,5	23,1 $\pm$ 1,3	27,8 $\pm$ 2,2	21,2 $\pm$ 1,0	34,1 $\pm$ 0,5
12	28,5 $\pm$ 1,5	53,0 $\pm$ 9,1	30,6 $\pm$ 3,1	30,1 $\pm$ 1,9	29,1 $\pm$ 3,2	41,2 $\pm$ 2,0
13	21,8 $\pm$ 0,3	46,1 $\pm$ 4,9	23,7 $\pm$ 3,3	27,6 $\pm$ 2,2	32,1 $\pm$ 7,8	43,6 $\pm$ 1,3
14	33,0 $\pm$ 0,9	46,0 $\pm$ 1,8	31,5 $\pm$ 3,8	29,3 $\pm$ 0,5	36,0 $\pm$ 7,3	46,5 $\pm$ 3,5
15	25,9 $\pm$ 0,7	39,0 $\pm$ 2,8	28,1 $\pm$ 4,4	33,6 $\pm$ 1,9	38,7 $\pm$ 7,9	39,1 $\pm$ 1,0
16	20,5 $\pm$ 1,0	34,7 $\pm$ 1,5	25,2 $\pm$ 4,8	22,9 $\pm$ 0,6	29,3 $\pm$ 7,3	31,7 $\pm$ 1,7
17	26,0 $\pm$ 1,0	40,7 $\pm$ 1,4	28,3 $\pm$ 1,7	28,9 $\pm$ 1,2	34,6 $\pm$ 5,5	39,7 $\pm$ 1,7
18	29,3 $\pm$ 2,6	43,9 $\pm$ 1,6	32,0 $\pm$ 7,6	34,2 $\pm$ 1,5	37,9 $\pm$ 4,4	47,6 $\pm$ 2,2
19	25,3 $\pm$ 5,2	40,4 $\pm$ 5,1	30,0 $\pm$ 4,6	30,2 $\pm$ 0,4	37,7 $\pm$ 7,2	44,5 $\pm$ 0,4
20	35,2 $\pm$ 35,2	43,5 $\pm$ 43,5	26,8 $\pm$ 16,8	44,0 $\pm$ 22,0	40,6 $\pm$ 40,6	35,1 $\pm$ 35,1
21	32,3 $\pm$ 0,0	25,2 $\pm$ 0,0	31,2 $\pm$ 0,0	27,1 $\pm$ 0,0	39,5 $\pm$ 0,0	35,8 $\pm$ 0,0
22	20,4 $\pm$ 0,0	26,1 $\pm$ 0,0	28,4 $\pm$ 0,0	25,8 $\pm$ 0,0	30,8 $\pm$ 0,0	33,8 $\pm$ 0,0
23	28,5 $\pm$ 0,0	25,4 $\pm$ 0,0	29,1 $\pm$ 0,0	34,2 $\pm$ 0,0	35,0 $\pm$ 0,0	33,2 $\pm$ 0,0
24	28,5 $\pm$ 0,0	29,2 $\pm$ 0,0	29,1 $\pm$ 0,0	34,2 $\pm$ 0,0	35,0 $\pm$ 0,0	33,2 $\pm$ 0,0

Al finalizar el período de tratamiento (cuando las ratas SHR tenían 20 semanas de vida), las ratas SHR que se habían tratado con 400 mg/kg/día de PFSC, y también las que se habían tratado con 800 mg/kg/día de BETA-G, tenían niveles de glucosa en plasma menores que las del grupo control negativo que habían ingerido agua. Al finalizar el período de tratamiento (cuando las ratas SHR tenían 20 semanas de vida), no observamos, por el contrario, diferencias significativas entre la glucemia de estos últimos animales y las glucemias de las ratas que se habían tratado con otras dosis de PFSC o con 50 mg/kg/día de Captopril, pero los animales que se habían tratado con otras dosis de PFSC presentaron también niveles de glucemia ligeramente menores que los del grupo control negativo. Por otra parte, al comparar en cada grupo la glucemia de las ratas a las 20 y 24 semanas de vida (es decir, la glucemia de las ratas al final del correspondiente tratamiento y la glucemia de esas mismas ratas cuatro semanas después de su retirada), únicamente se encontraron diferencias significativas en el grupo de ratas que se había tratado con 400 mg/kg/día de PFSC. Las ratas de este grupo, que al finalizar el tratamiento tenían niveles de glucosa en plasma menores que los de las ratas del grupo control negativo, presentaron un incremento de la glucemia cuando se les retiró el tratamiento y, cuatro semanas después de su retirada, no apreciamos diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de glucosa de estos animales y los niveles plasmáticos de glucosa de los animales de los restantes grupos, que mostraron también valores de esta variable muy similares entre sí a las 24 semanas de vida.

Los niveles de glucemia de los distintos grupos de ratas SHR, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 31, y aparecen en las tablas 14 (periodo de tratamiento) (página 179), y 15 (periodo de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.



**Figura 31.** Histogramas de los niveles plasmáticos de glucosa de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

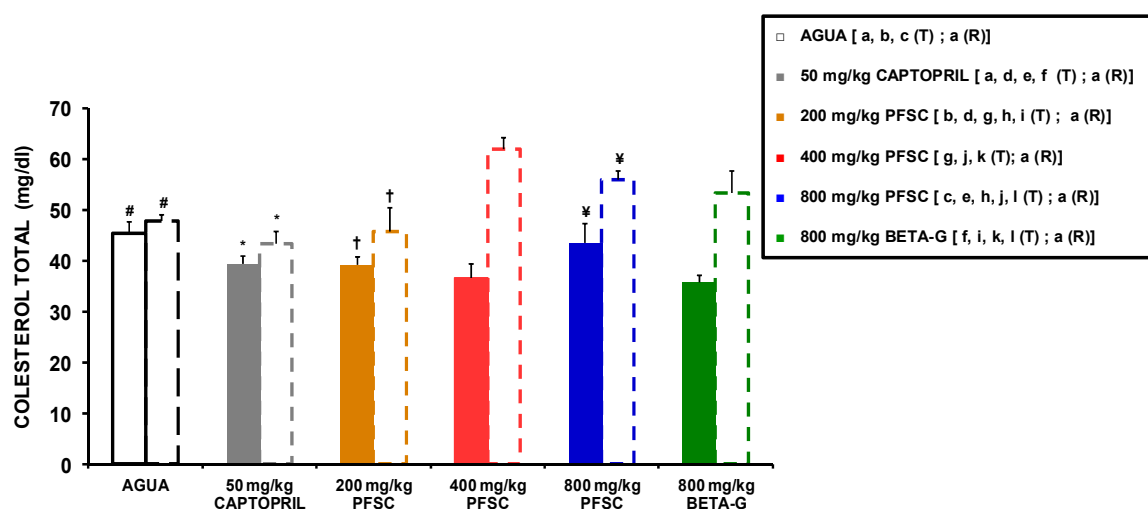
Al finalizar el período de tratamiento (cuando las ratas SHR tenían 20 semanas de vida), las ratas que se habían tratado con 400 mg/kg/día de PFSC y las que se habían tratado con 800 mg/kg/día de BETA-G, tenían también niveles de colesterol total y triglicéridos en plasma menores que las del grupo



## RESULTADOS

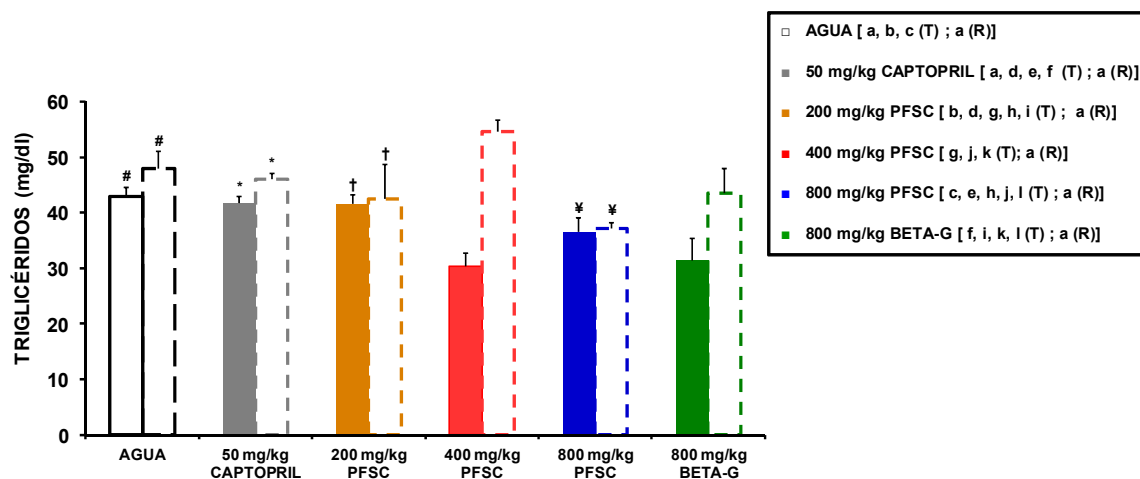
control negativo que habían ingerido agua. Al finalizar el período de tratamiento, no observamos, por el contrario, diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos en estos últimos animales, y los correspondientes valores de estas variables en las ratas que se habían tratado con otras dosis de PFSC o con 50 mg/kg/día de Captopril. No obstante, estos tratamientos ocasionaron también ligeras disminuciones de los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos en las ratas. Por otra parte, al comparar en cada grupo los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos que tenían las ratas a las 20 semanas de vida, con los niveles plasmáticos de estas variables en las ratas de 24 semanas de vida (es decir, el nivel plasmático de colesterol total y triglicéridos de las ratas al final del tratamiento y cuatro semanas después de haber retirado el mismo), se encontraron diferencias significativas para ambas variables en los grupos que se habían tratado con 400 mg/kg/día de PFSC y con 800 mg/kg/día de BETA-G. Así pues, las ratas de estos dos grupos, que, al finalizar el tratamiento, tenían niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos más bajos que las ratas del grupo control negativo, mostraron niveles de estas variables más altos cuatro semanas después. Estos eran incluso algo mayores que los de las ratas que habían ingerido agua a lo largo de todo el período experimental. No apreciamos, por lo tanto, diferencias significativas al comparar los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos de las ratas SHR de los distintos grupos al finalizar el período de retirada del tratamiento (momento en el que los animales tenían 24 semanas de vida).

Los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos de los distintos grupos de ratas, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en las figuras 32 y 33, y aparecen en las tablas 14 (periodo de tratamiento) (página 179), y 15 (periodo de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.



**Figura 32.** Histogramas de los niveles plasmáticos de colesterol total de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

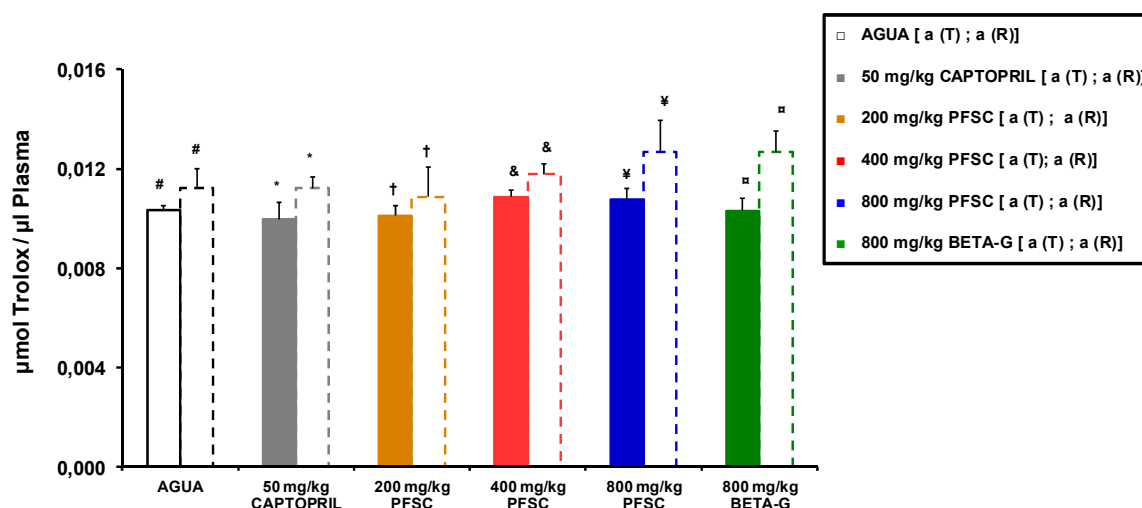
## RESULTADOS



**Figura 33.** Histogramas de los niveles plasmáticos de triglicéridos de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

Ninguno de los tratamientos utilizados modificó la capacidad antioxidante del plasma de las ratas SHR de nuestro estudio. Además, en todos los grupos, la capacidad antioxidante del plasma de las ratas era semejante cuando tenían 20 semanas de vida (al finalizar el tratamiento), y cuando tenían 24 semanas de vida (al finalizar el período de retirada del tratamiento). Los valores plasmáticos de ORAC eran, por ello, también muy semejantes en los animales de los distintos grupos cuando finalizó el periodo de retirada del tratamiento, momento en el que las ratas tenían 24 semanas de vida.

Los valores de ORAC obtenidos en el plasma de los distintos grupos de ratas, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 34, y aparecen en las tablas 14 (periodo de tratamiento) (página 179), y 15 (periodo de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.



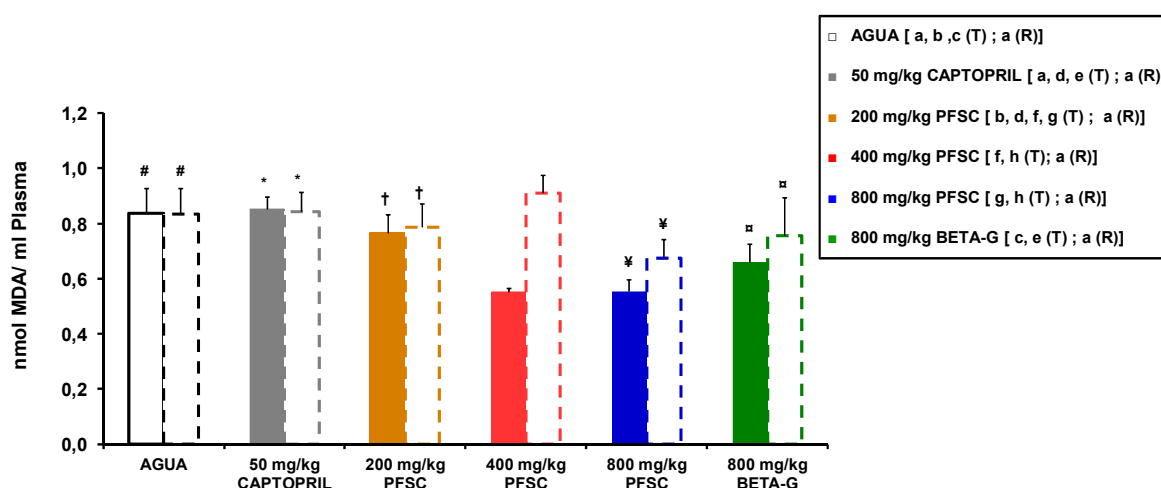
**Figura 34.** Histogramas de la capacidad antioxidante del plasma de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

Al finalizar el período de tratamiento (cuando los animales tenían 20 semanas de vida), las ratas que se habían tratado con 400 mg/kg/día de PFSC, y también las que se habían tratado con 800 mg/kg/día de PFSC, tenían

## RESULTADOS

concentraciones plasmáticas de MDA menores que las ratas del grupo control negativo que habían ingerido agua. Al finalizar el período de tratamiento, no observamos, por el contrario, diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de MDA de estos últimos animales y las concentraciones plasmáticas de MDA de las ratas que se habían tratado con 200 mg/kg/día de PFSC. Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de MDA de las ratas que se habían tratado con 800 mg/kg/día de BETA-G, o con 50 mg/kg/día de Captopril, y las concentraciones plasmáticas de MDA de las ratas que habían ingerido agua, pero el tratamiento con 800 mg/kg/día de BETA-G disminuyó ligeramente la concentración de este metabolito en el plasma de las ratas SHR. Por otra parte, al comparar en cada grupo las concentraciones plasmáticas de MDA de las ratas de 20 y 24 semanas de vida (es decir, la concentración plasmática de MDA de las ratas al final del correspondiente tratamiento y la concentración plasmática de MDA de esas mismas ratas cuatro semanas después de haber retirado el mismo), sólo se encontraron diferencias significativas en el grupo que se había tratado con 400 mg/kg/día de PFSC. Así pues, las ratas de éste grupo, que al finalizar el tratamiento tenían concentraciones plasmáticas de MDA menores que las de las ratas del grupo control negativo, presentaron un aumento de la concentración plasmática de este metabolito cuando se les retiró el tratamiento y, cuatro semanas después de su retirada, no apreciamos diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de MDA de estos animales y los niveles plasmáticos de MDA de los animales de los restantes grupos, que mostraron también valores de esta variable muy similares entre sí a las 24 semanas de vida.

Las concentraciones de MDA del plasma de los distintos grupos de ratas, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 35, y aparecen en las tablas 14 (periodo de tratamiento) (página 179), y 15, (periodo de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.



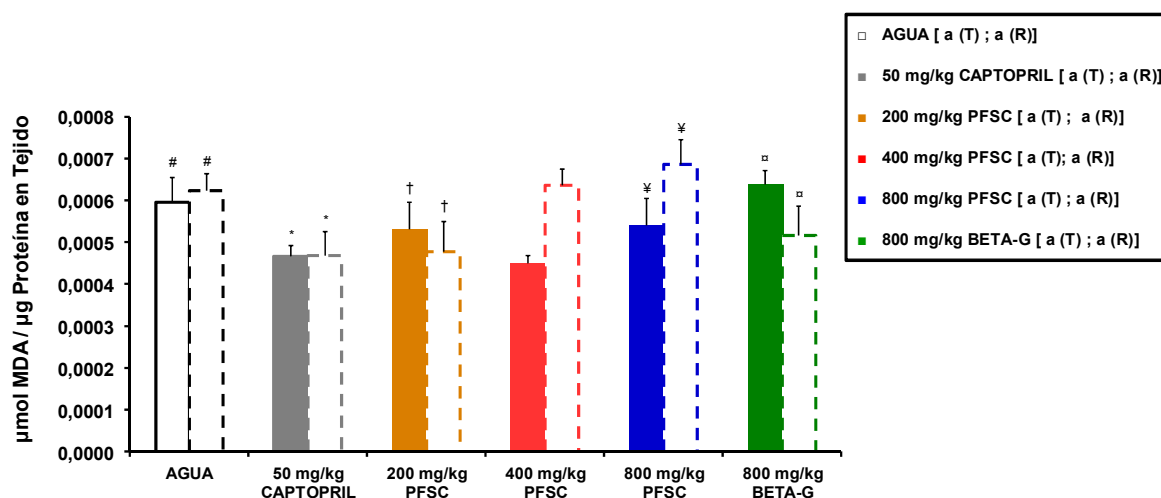
**Figura 35.** Histogramas de la concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

Ninguno de los tratamientos utilizados modificó la concentración hepática de MDA de las ratas SHR de nuestro estudio y, por lo tanto, cuando los animales tenían 20 semanas de vida, todos los grupos tenían niveles semejantes de éste metabolito en el tejido hepático. Además, la concentración

## RESULTADOS

hepática de MDA era muy semejante cuando las ratas tenían 20 semanas de vida (al finalizar el tratamiento), y cuando tenían 24 semanas de vida (al finalizar el período de retirada del tratamiento) en todos los grupos, excepto en el grupo que se había tratado con 400 mg/kg/día de PFSC, en el que se observó un aumento significativo en los niveles de MDA hepático cuatro semanas después de la retirada del producto. Los valores de la concentración hepática de MDA eran, por ello, también muy semejantes en los animales de los distintos grupos cuando finalizó el periodo de retirada del tratamiento, momento en el que las ratas tenían 24 semanas de vida.

Las concentraciones de MDA en el tejido hepático de las ratas de los distintos grupos, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 36, y aparecen en las tablas 14 (periodo de tratamiento) (página 179), y 15 (periodo de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.



**Figura 36.** Histogramas de la concentración de malonildialdehído (MDA) en tejido hepático de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

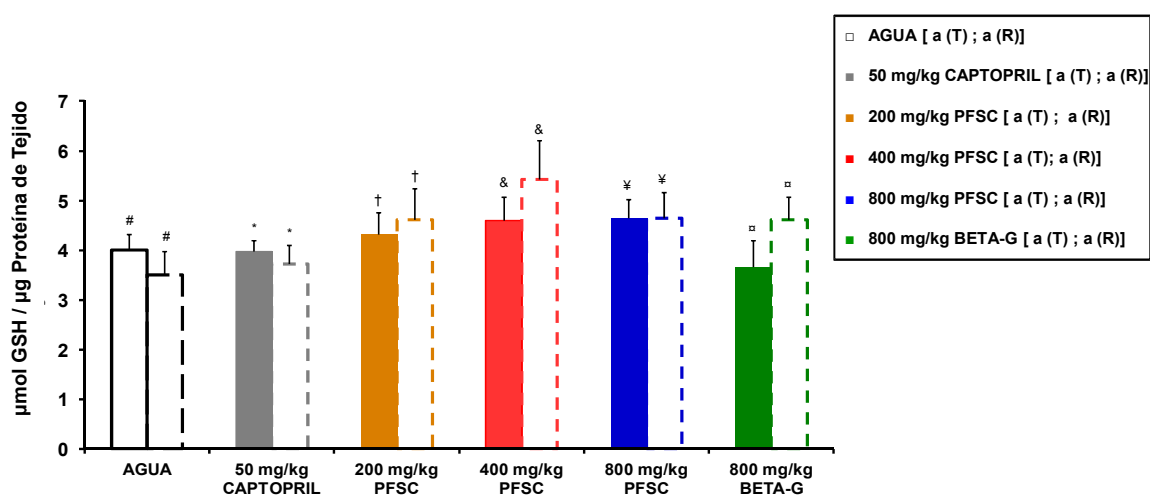
Ninguno de los tratamientos utilizados modificó significativamente los niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH) en las ratas SHR de nuestro estudio y, por lo tanto, cuando los animales tenían 20 semanas de vida, todos los grupos tenían niveles semejantes de éste tripéptido detoxificante en el tejido hepático. Sin embargo, se observó que el tratamiento con PFSC ocasionaba un ligero aumento de los niveles hepáticos de GSH. En todos los grupos, la concentración hepática de GSH era muy semejante cuando las ratas tenían 20 semanas de vida (al finalizar el tratamiento), y cuando tenían 24 semanas de



## RESULTADOS

vida (al finalizar el período de retirada del tratamiento). Los valores de la concentración hepática de GSH eran, también muy semejantes en los animales de los distintos grupos cuando finalizó el periodo de retirada del tratamiento, momento en el que las ratas tenían 24 semanas de vida.

Las concentraciones de GSH en el tejido hepático de las ratas de los distintos grupos, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 37 y aparecen en las tablas 14 (periodo de tratamiento) (página 179), y 15 (periodo de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.

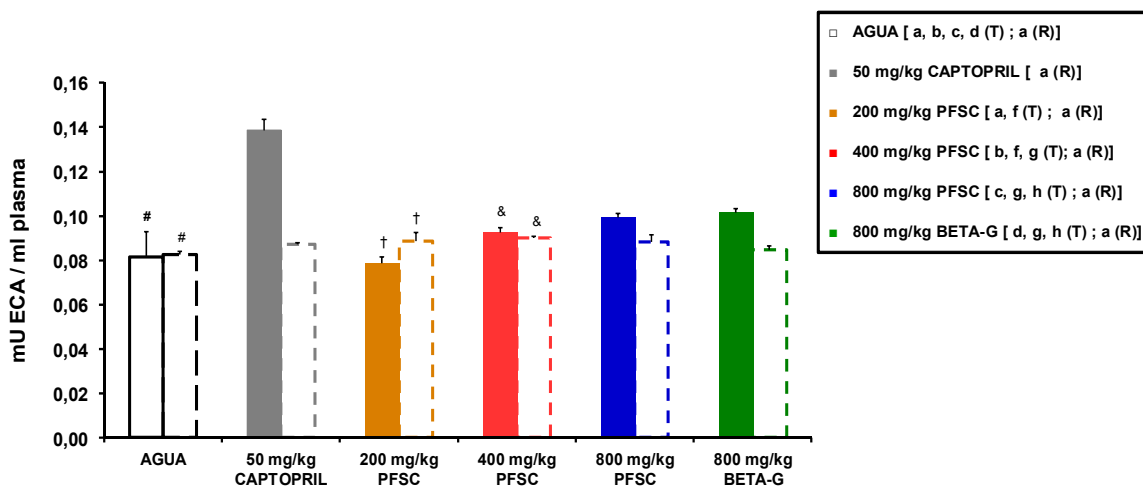


**Figura 37.** Histogramas de la concentración de glutatión reducido (GSH) en tejido hepático de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el plasma de las ratas SHR que se habían tratado con 50 mg/kg/día de Captopril, fue mayor que la actividad de esta enzima en el plasma de los animales de los restantes grupos al finalizar el período de tratamiento. No observamos, por el contrario, diferencias significativas en la actividad de la ECA, al comparar el plasma de los animales de los restantes grupos que no se habían tratado con el fármaco. Por otra parte, la actividad de la ECA en el plasma de los animales tratados con 50 mg/kg/día de Captopril disminuyó significativamente al retirar este tratamiento y, aunque los restantes tratamientos no habían modificado significativamente la actividad plasmática de esta enzima, el plasma de los animales tratados con 800 mg/kg de PFSC o con 800 mg/kg de BETA-G mostró también menor actividad enzimática cuatro semanas después de retirar estos tratamientos.

Los valores de la actividad de la ECA en el plasma de las ratas de los distintos grupos, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 38, y aparecen en las tablas 14 (período de tratamiento) (página 179), y 15 (período de retirada del tratamiento) (página 180), respectivamente.

## RESULTADOS



**Figura 38.** Histogramas de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el plasma de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (histogramas sólidos) y 24 (histogramas vacíos) semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento=T), las ratas diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC): 200 mg/kg (■), 400 mg/kg (■) y 800 mg/kg (■) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G) (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento=R), todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para 8 animales en T y para 4 animales en R. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para comparar los datos de los distintos grupos (letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de las ratas de cada grupo al final de T y al final de R (símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa). En ambos casos se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ .

**Tabla 14.** Valores plasmáticos de glucosa, colesterol total, triglicéridos, malonildialdehído (MDA), capacidad antioxidante, actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y concentraciones de MDA y glutatión reducido (GSH) en tejido hepático, de ratas espontáneamente hipertensas con 20 semanas de vida (final del periodo de tratamiento). Desde la semana 10 hasta la semana 20 de vida, las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo), diferentes dosis de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) o 800 mg/kg de beta glucan 0,75 mm (BETA-G). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para 8 animales.

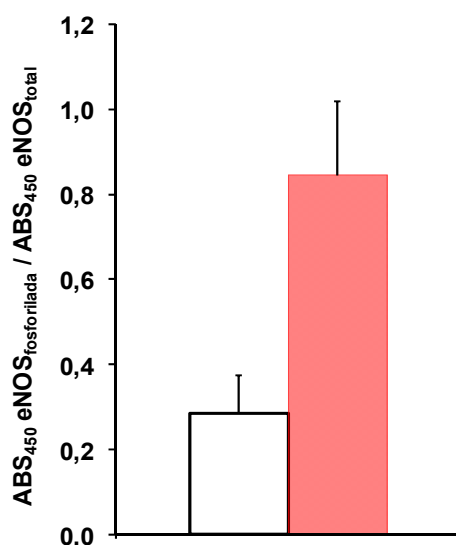
	Periodo de Tratamiento					
	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg	PFSC 200 mg/kg	PFSC 400 mg/kg	PFSC 800 mg/kg	BETA-G 800 mg/kg
Glucosa (mg/dl)	107,0 $\pm$ 3,2	105,8 $\pm$ 7,1	97,7 $\pm$ 2,6	84,8 $\pm$ 1,6	92,8 $\pm$ 1,6	88,6 $\pm$ 4,6
Colesterol Total (mg/dl)	45,4 $\pm$ 2,1	39,4 $\pm$ 2,1	39,2 $\pm$ 1,5	36,6 $\pm$ 2,7	43,5 $\pm$ 3,7	35,6 $\pm$ 1,4
Triglicéridos (mg/dl)	41,5 $\pm$ 1,6	41,7 $\pm$ 1,2	41,5 $\pm$ 1,6	30,3 $\pm$ 2,4	36,5 $\pm$ 2,5	31,1 $\pm$ 3,9
MDA (nmol MDA/ml plasma)	0,84 $\pm$ 0,0901	0,85 $\pm$ 0,0449	0,76 $\pm$ 0,0660	0,55 $\pm$ 0,0123	0,55 $\pm$ 0,043	0,65 $\pm$ 0,0667
ORAC ( $\mu$ mol Trolox/ $\mu$ l plasma)	0,01 $\pm$ 0,0002	0,01 $\pm$ 0,0007	0,01 $\pm$ 0,0004	0,01 $\pm$ 0,0003	0,01 $\pm$ 0,0004	0,01 $\pm$ 0,0005
ECA (mU ECA/ml plasma)	0,08 $\pm$ 0,0111	0,14 $\pm$ 0,0049	0,07 $\pm$ 0,0028	0,09 $\pm$ 0,0019	0,09 $\pm$ 0,0016	0,1015 $\pm$ 0,0018
MDA ( $\mu$ mol MDA/ $\mu$ g proteína en tejido)	0,0006 $\pm$ 0,00006	0,0004 $\pm$ 0,00003	0,0005 $\pm$ 0,00006	0,0004 $\pm$ 0,00002	0,0005 $\pm$ 0,00006	0,0006 $\pm$ 0,00003
GSH ( $\mu$ mol GSH/ $\mu$ g proteína en tejido)	4,0 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,5

**Tabla 15.** Valores plasmáticos de glucosa, colesterol total, triglicéridos y malonildialdehído (MDA), capacidad antioxidante, actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y concentraciones de MDA y glutatión reducido (GSH) en tejido hepático. Desde la semana 21 hasta la semana 24 de vida, todas las ratas de cada uno de los diferentes grupos. Ingerían diariamente agua *ad libitum*. Los valores representan la media  $\pm$  ESM para 4 animales.

	Periodo de retirada del Tratamiento					
	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg	PFSC 200 mg/kg	PFSC 400 mg/kg	PFSC 800 mg/kg	BETA-G 800 mg/kg
Glucosa (mg/dl)	97,6 $\pm$ 1,4	91,0 $\pm$ 2,4	110,7 $\pm$ 4,4	115,2 $\pm$ 11,9	88,5 $\pm$ 1,9	86,14 $\pm$ 1,8
Colesterol Total (mg/dl)	47,8 $\pm$ 1,2	43,4 $\pm$ 2,2	45,8 $\pm$ 4,5	61,9 $\pm$ 2,3	55,8 $\pm$ 1,8	53,3 $\pm$ 4,3
Triglicéridos (mg/dl)	47,9 $\pm$ 3,1	46,0 $\pm$ 1,0	42,6 $\pm$ 6,2	54,6 $\pm$ 2,1	37,1 $\pm$ 1,1	43,5 $\pm$ 4,4
MDA (nmol MDA/ml plasma)	0,83 $\pm$ 0,0946	0,84 $\pm$ 0,0709	0,78 $\pm$ 0,0859	0,91 $\pm$ 0,0644	0,67 $\pm$ 0,0676	0,75 $\pm$ 0,1386
ORAC ( $\mu$ mol Trolox/ $\mu$ l plasma)	0,01 $\pm$ 0,0008	0,01 $\pm$ 0,0004	0,01 $\pm$ 0,0012	0,01 $\pm$ 0,0004	0,01 $\pm$ 0,0013	0,01 $\pm$ 0,0008
ECA (mU ECA/ml plasma)	0,08 $\pm$ 0,0012	0,08 $\pm$ 0,0008	0,09 $\pm$ 0,0008	0,08 $\pm$ 0,0009	0,08 $\pm$ 0,0033	0,08 $\pm$ 0,0019
MDA ( $\mu$ mol MDA/ $\mu$ g proteína en tejido)	0,0006 $\pm$ 0,00004	0,0004 $\pm$ 0,00006	0,0004 $\pm$ 0,00007	0,0006 $\pm$ 0,00004	0,0007 $\pm$ 0,00006	0,0005 $\pm$ 0,00007
GSH ( $\mu$ mol GSH/ $\mu$ g proteína en tejido)	3,5 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,4

La actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en el plasma de las ratas SHR que habían recibido tratamiento diario con 400 mg/kg de PFSC, fue mayor que la actividad de esta enzima en el plasma de las ratas SHR que habían ingerido agua diariamente a lo largo del estudio (control negativo). En realidad, cuando las ratas tenían 20 semanas de vida, la relación entre la absorbancia a 450 nm de las muestras plasmáticas cuando se cuantificaba la eNOS fosforilada, y la absorbancia a 450 nm de las muestras plasmáticas cuando se cuantificaba la eNOS total (relación que nos permite establecer la actividad de esta enzima), aumentó de forma significativa, y fue casi 3 veces mayor en el grupo de ratas SHR tratado con 400 mg/kg/día de PFSC que en el grupo de las ratas SHR que había ingerido agua. De hecho, el valor del cociente anteriormente mencionado fue  $0,8489 \pm 0,15$  nm (n=8) en el grupo de ratas tratado con PFSC, y el valor de este cociente fue  $0,2946 \pm 0,04$  nm (n=8) en el grupo de animales que ingerían agua.

Los valores de la relación entre la absorbancia a 450 nm de las muestras plasmáticas cuando se cuantificaba la eNOS fosforilada, y la absorbancia a 450 nm de las muestras plasmáticas cuando se cuantificaba la eNOS total se reflejan a continuación en la figura 39, página 182.



**Figura 39.** Histogramas de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en el plasma (expresada como el cociente entre la absorbancia a 450 nm ( $ABS_{450}$ ) de las muestras plasmáticas cuando se cuantificaba la eNOS fosforilada, y la absorbancia a esta misma longitud de onda de las muestras plasmáticas cuando se cuantificaba la eNOS total) de ratas espontáneamente hipertensas con 20 semanas de vida. Desde las 10 hasta las 20 semanas de vida, las ratas espontáneamente hipertensas, ingerían respectivamente agua (□) o 400 mg/kg/día de producto rico en fibra soluble de cacao (■). Se utilizó una t de Student para comparar los datos de los dos grupos y existió diferencia significativa entre ambos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. RESULTADOS EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

Las preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR, pre-contraídas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, se relajaron cuando se administró PFSC en el baño de órganos. En las preparaciones con endotelio intacto, se observó una relajación dosis dependiente cuando se utilizaban concentraciones de PFSC comprendidas entre  $10^{-6}$ - $10^{-3}$  mg/ml. La altura de la contracción producida por  $10^{-5}$  M de Metoxamina disminuyó aproximadamente un 50% ( $49,4 \pm 7,5\%$ ), cuando se administró la dosis más alta de este compuesto ( $10^{-3}$  mg/ml). Sin

embargo, en las preparaciones de anillos de aorta en las que se había destruido el endotelio, la altura de la contracción producida por  $10^{-5}$  M de Metoxamina solo disminuyó aproximadamente un 18% ( $18,3 \pm 2,8\%$ ) cuando se administró la dosis mayor ( $10^{-3}$  mg/ml) de PFSC. Es decir, la relajación observada con PFSC en las preparaciones con endotelio fue mucho mayor que la observada en las preparaciones que carecían de endotelio.

La administración de  $10^{-4}$  M de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) en las preparaciones con endotelio de anillos de aorta de ratas SHR, pre-contráidas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, no modificó el tono arterial. Además, PFSC ocasionó también una relajación dosis dependiente en las preparaciones con endotelio incubadas con  $10^{-4}$  M de L-NAME. La relajación máxima producida por PFSC en presencia de  $10^{-4}$  M de L-NAME, fue sin embargo, menor ( $30,9 \pm 4,7\%$ ) que la observada cuando PFSC se administraba en preparaciones con endotelio no tratadas ( $49,4 \pm 7,5\%$ ). Cuando se incubó el tejido arterial con  $10^{-4}$  M de L-NAME, se observó en realidad un desplazamiento de la curva de relajación al administrar PFSC, porque todas las dosis de este compuesto mayores de  $10^{-5}$  M fueron menos eficaces en presencia de  $10^{-4}$  M de L-NAME (ver figura 40, página 184).

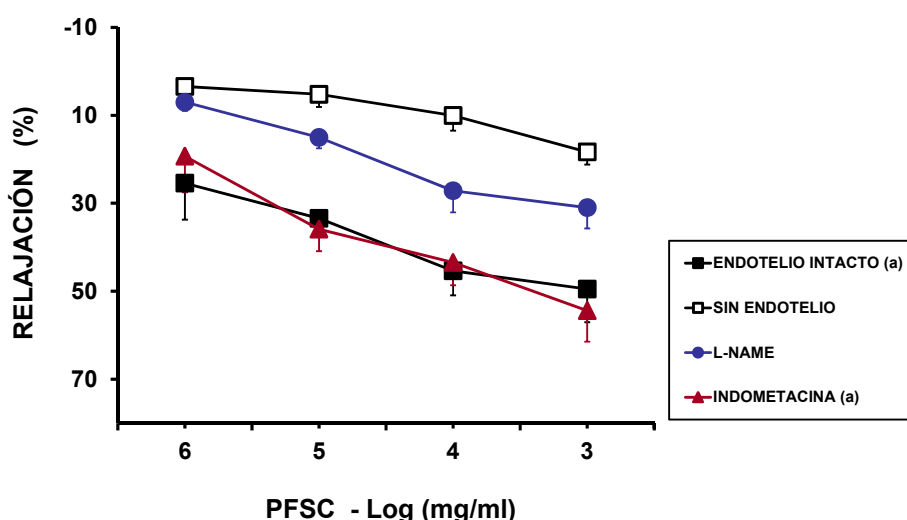
La administración de  $10^{-5}$  M de Indometacina en las preparaciones con endotelio de anillos de aorta de ratas SHR, pre-contráidas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, no modificó el tono arterial. Además, la presencia de  $10^{-5}$  M de Indometacina en el baño de órganos, no alteró la respuesta de relajación de PFSC en las preparaciones de anillos de aorta, pre-contráidas con  $10^{-5}$  M de



## RESULTADOS

Metoxamina. De hecho, la relajación producida por PFSC en preparaciones de anillos de aorta, pre-contraídas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, que se habían incubado con  $10^{-5}$  M de Indometacina ( $54,4 \pm 7,0\%$ ), fue muy similar a la relajación producida por esta fibra en preparaciones de anillos de aorta, pre-contraídas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, que no se habían incubado anteriormente con ningún compuesto ( $49,4 \pm 7,5\%$ ) (ver figura 40).

Los valores del porcentaje de relajación producido por PFSC en las distintas preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la figura 40 y aparecen en la tabla 16, página 185.



**Figura 40.** Relajación producida por concentraciones acumulativas ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  mg/ml) de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC), en diferentes preparaciones de anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas, pre-contraídas con Metoxamina ( $10^{-5}$  M): Preparaciones con endotelio intacto (■), preparaciones sin endotelio (□), preparaciones con endotelio intacto incubadas con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) ( $10^{-4}$ M) (●), y preparaciones con endotelio intacto incubadas con Indometacina ( $10^{-5}$ M) (▲). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 6 preparaciones, procedentes de 6 animales distintos. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras similares indican que no existen diferencias significativas.

**Tabla 16.** Relajación producida en diferentes preparaciones de anillos de aorta, de ratas espontáneamente hipertensas, pre-contraídas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, por distintas concentraciones de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para un mínimo de 6 preparaciones, procedentes de 6 animales distintos.

PFSC (mg/ml)	Preparaciones con Endotelio	Preparaciones sin Endotelio	Preparaciones con Endotelio intacto incubadas con	
			$10^{-4}$ M L-NAME	$10^{-5}$ M Indometacina
$10^{-6}$	25,4 $\pm$ 8,3	3,4 $\pm$ 2,4	7,0 $\pm$ 1,9	19,3 $\pm$ 8,2
$10^{-5}$	33,4 $\pm$ 3,9	5,2 $\pm$ 2,8	15,0 $\pm$ 2,5	35,8 $\pm$ 5,0
$10^{-4}$	45,3 $\pm$ 5,5	10,0 $\pm$ 3,4	27,1 $\pm$ 4,9	43,4 $\pm$ 5,1
$10^{-3}$	49,4 $\pm$ 7,5	18,3 $\pm$ 2,8	30,9 $\pm$ 4,7	54,4 $\pm$ 7,0

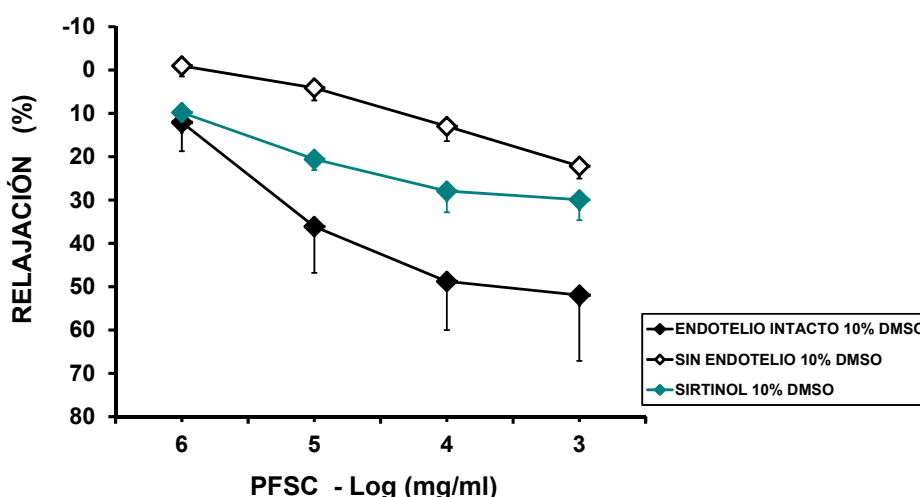
L-NAME= N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster.

Antes de describir los resultados obtenidos en las preparaciones con endotelio de anillos de aorta de ratas SHR incubadas con  $10^{-5}$  M de Sirtinol, hay que recordar que, para estos ensayos, el Sirtinol se disolvía en una solución que contenía agua con un 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO). La administración de  $10^{-5}$  M de Sirtinol en las preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR, pre-contraídas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, no modificó el tono arterial. PFSC ocasionó una relajación dosis dependiente en las preparaciones incubadas con  $10^{-5}$  M de Sirtinol, pero la relajación máxima producida por PFSC en presencia de este inhibidor de sirtuína-1 (SIRT-1), fue sin embargo menor ( $29,9 \pm 5,2\%$ ), que la producida por PFSC en preparaciones intactas que se habían incubado con la misma cantidad de DMSO ( $62,3 \pm 12,3\%$ ). La curva de relajación obtenida al administrar PFSC se desplazó cuando el tejido arterial se incubaba

## RESULTADOS

previamente con  $10^{-5}$  M de Sirtinol, ya que todas las dosis de PFSC ( $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  mg/ml) utilizadas fueron menos eficaces en presencia del inhibidor de SIRT-1 (ver figura 41).

Los valores del porcentaje de relajación producido por PFSC en las distintas preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR, que corresponden a los 7 resultados anteriores, se reflejan en la figura 41, y aparecen en la tabla 17, página 183.



**Figura 41.** Relajación producida por diferentes concentraciones acumulativas ( $10^{-6}$  –  $10^{-3}$  mg/ml) del producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC), en diferentes preparaciones de anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas pre-contraídas, con Metoxamina ( $10^{-5}$  M). Preparaciones con endotelio intacto (◆), preparaciones sin endotelio (◇), preparaciones con endotelio intacto incubadas con Sirtinol – 10% dimetilsulfóxido (DMSO) ( $10^{-5}$  M) (◆). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 6 preparaciones procedentes de 6 animales distintos. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Se observaron diferencias significativas entre todos los grupos.

**Tabla 17.** Relajación producida en diferentes preparaciones de anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas pre-contraídas con  $10^{-5}$  M de Metoxamina, por distintas concentraciones del producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC). Los valores representan la media  $\pm$  ESM para un mínimo de 6 preparaciones procedentes de 6 animales distintos.

PFSC (mg/ml)	Preparaciones con Endotelio incubadas con 10% DMSO	Preparaciones sin Endotelio incubadas con 10% DMSO	Preparaciones con Endotelio incubadas con $10^{-5}$ M Sirtinol-10% DMSO
$10^{-6}$	$22,5 \pm 6,2$	$0,2 \pm 1,2$	$9,8 \pm 6,1$
$10^{-5}$	$36,1 \pm 10,7$	$4,1 \pm 1,9$	$20,5 \pm 4,3$
$10^{-4}$	$54,9 \pm 10,4$	$12,9 \pm 3,1$	$27,9 \pm 2,7$
$10^{-3}$	$62,3 \pm 12,3$	$22,2 \pm 4,1$	$29,9 \pm 5,2$

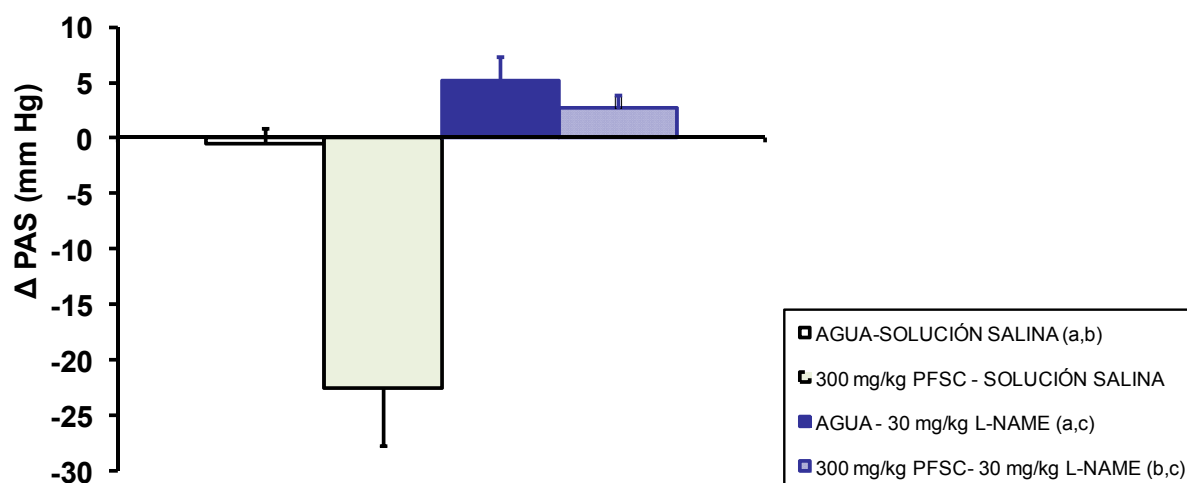
DMSO= Dimetilsulfóxido.

#### 4.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS PARA ESTABLECER LA IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ENDOTELIALES VASODILATADORES EN EL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL PRODUCTO RICO EN FIBRA SOLUBLE DE CACAO

Las ratas SHR utilizadas para estos ensayos tenían unos valores basales de la PAS de  $218,2 \pm 4,1$  mm Hg ( $n=50$ ). Esta variable no se modificó cuando administrábamos únicamente agua por vía oral y solución salina por vía intraperitoneal a los animales. Sin embargo, la administración por vía oral de 300 mg/kg de PFSC causó un descenso significativo de la PAS ( $-22,1 \pm 4,0$  mm Hg) en las ratas SHR. De hecho, esta variable alcanzó valores de  $194,6 \pm 6,0$

## RESULTADOS

mm Hg en las ratas a las que primero administrábamos 300 mg/kg de PFSC por vía oral y cuatro horas más tarde inyectábamos solución salina por vía intraperitoneal. Sin embargo, la PAS aumentó de forma significativa, alcanzando valores de  $233,6 \pm 6,8$  mm Hg, cuando administrábamos a las ratas primero agua por vía oral y cuatro horas después 30 mg/kg de L-NAME por vía intraperitoneal. Las ratas SHR a las que administrábamos primero 300 mg/kg de PFSC por vía oral y cuatro horas después 30 mg/kg de L-NAME por vía intraperitoneal, presentaron valores de PAS también algo mayores que los de las ratas a las que habíamos administrado únicamente agua y solución salina. Es decir, en estos animales que recibían 300 mg/kg de PFSC y 30 mg/kg de L-NAME, no se pudo apreciar el descenso de la PAS que habíamos observado en las ratas que habían recibido 300 mg/kg de PFSC y solución salina (ver figura 42, página 189).

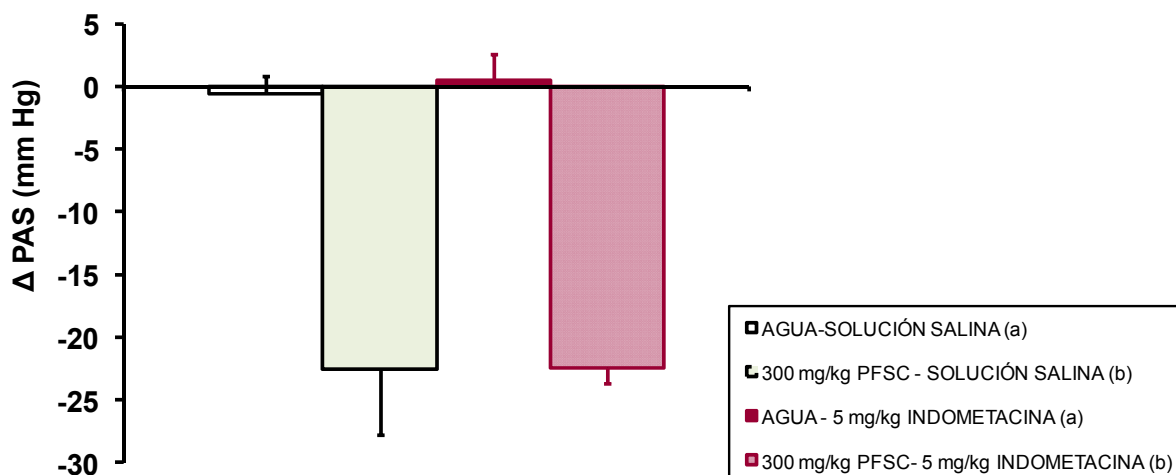


**Figura 42.** Histogramas de la modificación de la presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas, por distintos tratamientos: agua y solución salina (□), 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) y solución salina (■), agua y 30 mg/kg de L-NAME (■) y 300 mg/kg PFSC y 30 mg/kg de L-NAME (■). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

La PAS de las ratas SHR no se modificó cuando administrábamos a estos animales primero agua por vía oral y cuatro horas después 5 mg/kg de Indometacina por vía intraperitoneal. Además, las ratas a las que administramos primero 300 mg/kg de PFSC por vía oral y cuatro horas después 5 mg/kg de Indometacina por vía intraperitoneal, presentaron valores de PAS ( $205,0 \pm 8,7$  mm Hg) semejantes que los de las ratas que habían recibido 300 mg/kg de PFSC, por vía oral, primero, y solución salina por vía intraperitoneal cuatro horas más tarde ( $193,2 \pm 5,8$  mm Hg). Es decir, en estos animales que recibían 300 mg/kg de PFSC y 5 mg/kg de Indometacina, se observó un

## RESULTADOS

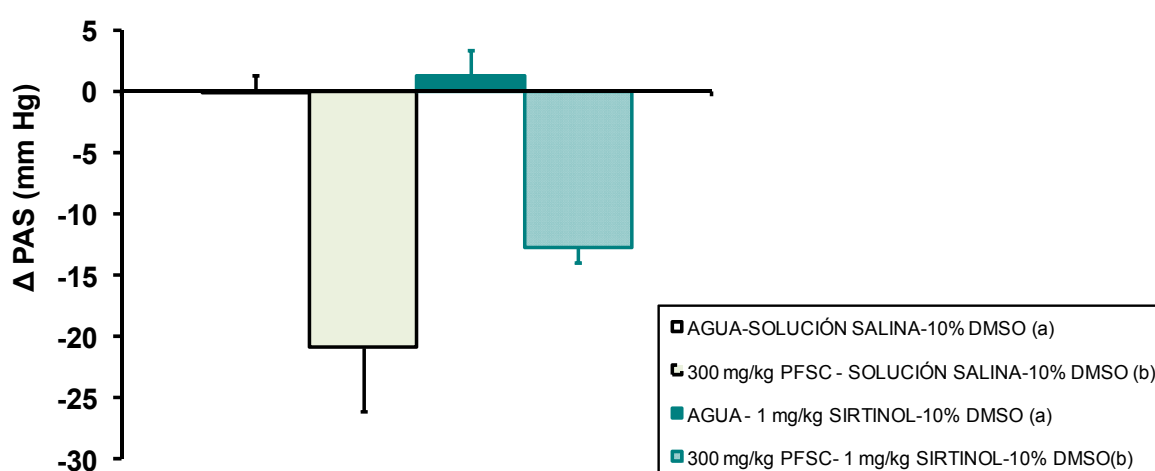
descenso de la PAS similar al observado en las ratas que recibían 300 mg/kg de PFSC y solución salina (ver figura 43).



**Figura 43.** Histogramas de la modificación de la presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas, producida por distintos tratamientos: agua y solución salina (□), 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) y solución salina (■), agua y 5 mg/kg de Indometacina (■), y 300 mg/kg PFSC y 5 mg/kg de Indometacina (■). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

La PAS de las ratas SHR no se modificó cuando administrábamos a estos animales primero agua por vía oral y cuatro horas después solución salina con un 10% de DMSO por vía intraperitoneal. Las ratas SHR a las que administrábamos 300 mg/kg PFSC por vía oral y solución salina con un 10% de DMSO por vía intraperitoneal, mostraban un descenso significativo de la PAS ( $-20,9 \pm 1,3$  mm Hg). Esta variable alcanzó valores de  $193,2 \pm 5,8$  mm Hg en estos animales seis horas después de haber administrado 300 mg/kg PFSC. La PAS de las ratas SHR no se modificó cuando administrábamos primero a estos animales agua por vía oral, y cuatro horas después 1 mg/kg de Sirtinol disuelto

en 1 ml de solución salina con un 10% de DMSO por vía intraperitoneal, pero las ratas a las que administramos primero 300 mg/kg de PFSC por vía oral y cuatro horas después 1 mg/kg de Sirtinol (disuelto en 1 ml de suero salino con un 10% de DMSO) por vía intraperitoneal, presentaron valores de PAS menores que los de las ratas a las que habíamos administrado agua y solución salina con un 10% de DMSO. El descenso de la PAS observado en estos animales era algo menor ( $-12,75 \pm 3,6$  mm Hg), aunque sin diferencia significativa, que el descenso de la PAS observado en los animales que recibían 300 mg/kg de PFSC y 1 ml de suero salino con un 10% de DMSO (ver figura 44).



**Figura 44.** Histogramas de la modificación en la presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas, producida por distintos tratamientos: agua y solución salina de DMSO al 10% (□), 300 mg/kg de producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) y solución salina de DMSO al 10% (■), agua y 1 mg/kg de Sirtinol (■), y 300 mg/kg PFSC y 1 mg/kg de Sirtinol (■). Los datos representan valores medios  $\pm$  ESM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $p < 0,05$ . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.



## RESULTADOS

Los valores de la presión arterial que tenían las ratas SHR después de todas las pautas de tratamiento señaladas anteriormente, se reflejan en la tabla 18, página 193.

**Tabla 18.** Valores de la presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) después de distintos tratamientos.

ADMINISTRACIÓN ORAL	ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL	Medidas de la PAS (mm Hg)	
		Hora 0	Hora 6
AGUA (1 ml)	Suero salino	220,7 ± 5,2	220,1 ± 6,5
	Suero salino + 10 % DMSO	206,1 ± 4,4	206,2 ± 6,4
	Suero salino + 30 mg/kg L-NAME	228,6 ± 4,7	233,6 ± 6,8
	Suero salino + 5 mg/kg Indometacina	221,0 ± 4,5	221,5 ± 6,7
	Suero salino + 1 mg/kg Sirtinol- 10 % DMSO	205,4 ± 7,2	206,7 ± 8,3
300 mg/kg PFSC (disuelto en 1 ml de agua)	Suero salino	216,7 ± 3,0	194,6 ± 6,0
	Suero salino + 10 % DMSO	214,1 ± 4,5	193,2 ± 5,8
	Suero salino + 30 mg/kg L-NAME	232,8 ± 0,8	230,1 ± 2,1
	Suero salino + 5 mg/kg Indometacina	228,4 ± 3,5	205,9 ± 8,7
	Suero salino + 1 mg/kg Sirtinol - 10 % DMSO	208,7 ± 3,9	196 ± 7,5

L-NAME=N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster; DMSO=Dimetilsulfóxido; PFSC=Producto rico en fibra soluble de cacao.



## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

Se conocen desde hace tiempo los efectos beneficiosos de la fibra dietética a nivel cardiovascular. Se ha descrito concretamente que la fibra soluble puede controlar el perfil lipídico y disminuir los niveles de colesterol en plasma (Brown et al., 1999; Kerckhoffs et al., 2003; Solá et al., 2010; Hung et al 2012; Iwata et al., 2012). La fibra soluble también puede disminuir el peso corporal (Slavin, 2005; Babio et al., 2010; Grover et al., 2011; Ramos et al., 2011). Además, la fibra soluble puede mejorar la glucemia y la resistencia insulínica (Aller et al., 2004; Li et al., 2004; Sánchez et al., 2008; Sánchez et al., 2010a; Grover et al., 2011). En ésta Tesis Doctoral hemos estudiado los posibles efectos antihipertensivos de distintas fibras. Especialmente hemos estudiado los efectos antihipertensivos de un producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Comenzaremos, sin embargo, esta Discusión, poniendo de manifiesto cómo se llegaron a conocer todos estos efectos beneficiosos de la fibra dietética que acabamos de mencionar, ya que en esta Tesis Doctoral también evaluamos los efectos de PFSC y de otra de las fibras utilizadas, sobre el peso corporal, la glucemia, el colesterol total y los triglicéridos de las ratas SHR.

Los cereales son una fuente muy importante de fibra dietética, y la avena es concretamente una de las fibras más estudiadas. En 1963, De Groot y colaboradores demostraron que el consumo de un pan enriquecido en avena, durante tres semanas, reducía en un 11% los niveles de colesterol plasmáticos (De Groot et al., 1963). Ripsin y colaboradores en 1992 (Ripsin et al., 1992), y

posteriormente Brown y colaboradores en 1999 (Brown et al., 1999), revisaron la información científica existente sobre la relación entre consumo de avena y colesterol, y concluyeron que el consumo diario de 3 g de esta fibra soluble reducía el colesterol sanguíneo en 5,9 mg/dl en personas que no tenían niveles altos de colesterol. Este consumo producía a su vez una disminución de 18,6 mg/dl en las personas que tenían inicialmente niveles altos de colesterol. En 1997, la Agencia de Alimentos y Fármacos americana (*Food and Drug Administration*, FDA) aprobó que se registrase el salvado de avena como primer alimento para reducir el colesterol. Después de revisar 37 estudios, esta organización concluyó que para reducir significativamente los niveles de colesterol, se debían consumir al menos 3 g al día de betaglucano de avena (*Food and Drug Administration*, 1997). Se han publicado después muchos trabajos que relacionan la administración de betaglucano de avena con la disminución de colesterol (Rondanelli et al., 2001; Wood, 2002; Kerckhoffs et al., 2003; Queenan et al., 2007; Tiwari et al., 2011).

El betaglucano está también presente en otros cereales distintos de la avena, como es la cebada. El betaglucano de cebada presenta también efectos hipocolesterolemiantes y es capaz de mejorar el perfil lípidico en pacientes con dislipemias (Smith et al., 2008; Talati et al., 2009; Abumweis et al., 2010). El betaglucano de cebada es además capaz de disminuir la glucemia y la resistencia insulínica en animales (Choi et al., 2010; Brockman et al., 2012) y en humanos (Thondre & Henry 2009; Bays et al., 2011; Chillo et al., 2011; Finocciaro et al., 2012). En realidad, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha aprobado recientemente como alegación de salud para

el betaglucano procedente de cualquier cereal, que este producto ayuda a mantener los niveles de colesterol. También ha aprobado como alegación de salud para el betaglucano procedente de avena o cebada, que el consumo de este compuesto con la dieta ayuda a disminuir el incremento de la glucosa que se produce después de las comidas (EFSA, 2012).

En esta Tesis Doctoral, utilizamos cuatro productos ricos en fibra. Se utilizó un producto rico en betaglucano procedente de cebada, denominado beta glucan 0,75 mm (BETA-G). También utilizamos otro producto, denominado chitosan 95 (CHIT), que es rico en chitosan, una fibra soluble que se obtiene del exoesqueleto del camarón *Pandalus borealis*. Asimismo, utilizamos un producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC), que se obtiene a partir de la cascarilla del cacao, y que nuestro grupo de investigación ya había estudiado en ratas Zucker. Quisimos también evaluar un producto rico en fibra insoluble, denominado almidón hi-maize 260 (AHM), procedente de un maíz híbrido con alto contenido en amilosa. La fibra que contiene AHM es mayoritariamente almidón resistente tipo 2, una fibra que se considera insoluble, aunque es capaz de fermentar en el colon, al igual que la mayoría de las fibras solubles.

Ya hemos comentado los efectos beneficiosos del betaglucano procedente de cebada. Existen también algunos estudios que han demostrado propiedades saludables para el chitosan y el almidón resistente. El chitosan mostró efectos hipocolesterolemiantes en un modelo de ratas SHR obesas que presentan las alteraciones propias del síndrome metabólico. Este compuesto ocasionó asimismo una disminución del peso corporal, la glucemia y los



triglicéridos en estos animales, y también en las ratas Wistar-Kyoto (WKY) que se utilizaban como control (Anraku et al., 2010). Algunos almidones resistentes también han mostrado efectos beneficiosos sobre la glucosa, los lípidos plasmáticos y la obesidad (Aller et al., 2010; Belobrajdic et al., 2012). La EFSA ha aprobado recientemente la reducción en la respuesta glicémica postprandial como alegación de salud para el almidón resistente (EFSA Journal, 2011).

Los efectos de la fibra dietética sobre la presión arterial se han estudiado, sin embargo, mucho menos que los efectos de la fibra sobre otros factores de riesgo cardiovascular. En realidad, existen pocos estudios que intenten demostrar que la fibra dietética tiene efectos antihipertensivos. El objetivo inicial de esta Tesis Doctoral fue precisamente analizar los efectos de los cuatro productos anteriormente mencionados (AHM, BETA-G, CHIT y PFSC), sobre la presión arterial de las ratas SHR. Estos animales son un modelo experimental de hipertensión muy utilizado, ya que el desarrollo de hipertensión en ellos presenta muchas similitudes con el desarrollo de la hipertensión esencial en humanos (Zicha & Kunes, 1999; FitzGerald et al., 2004). Se llevaron a cabo ensayos de administración intragástrica aguda, de distintas dosis de estos productos, en las ratas SHR, y se midió la presión arterial de las ratas antes de la administración y en distintos momentos después de la misma. Para la medida de la presión arterial, se utilizó la técnica del manguito en la cola, descrita por Buñag en 1973. La medida de la presión arterial con esta técnica tiene el mismo fundamento que la medida de la presión arterial con un esfigmomanómetro en humanos, pero cuando se mide la presión arterial colocando el manguito en la cola de las ratas, la medida de la presión

arterial sistólica (PAS) resulta siempre mucho más fiable que la medida de la presión arterial diastólica (PAD). Hay que tener además en cuenta que la medida de la presión arterial con la técnica del manguito en la cola, requiere inmovilizar al animal en un cepo. Esto puede ocasionarle estrés, y en algunos casos aumentarle también la presión arterial. Para minimizar estos problemas, tuvimos la precaución de acostumbrar previamente a las ratas al procedimiento. Además, el valor final de la presión arterial, se obtuvo hallando la media de al menos cinco medidas homogéneas de esta variable. De los productos administrados de forma aguda por vía intragástrica, únicamente PFSC fue capaz de producir disminuciones significativas de la PAS en las ratas SHR. Los demás productos prácticamente no modificaron la PAS en estos animales. Por consiguiente, los valores de la PAS, antes y después de administrar los restantes compuestos, fueron muy semejantes, y fueron además muy parecidos a los valores de la PAS en los animales a los que administrábamos agua por vía intragástrica (control negativo).

En esta Tesis Doctoral, también intentamos dilucidar el mecanismo por el cual PFSC disminuía la presión arterial de las ratas SHR. En realidad, el reglamento relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos, que figura en el código alimentario (*Codex Alimentarius*) regulado por la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Reglamento CE N° 1924/2006), establece que es necesario demostrar las propiedades funcionales alegadas, pero este reglamento también sugiere que se estudien los mecanismos de acción implicados en los efectos demostrados.

El motivo por el que PFSC disminuía la presión arterial en las ratas SHR, podría estar relacionado con la presencia de otros micronutrientes distintos de la fibra en este producto. De hecho, no podemos olvidar que PFSC contiene un 2,24% de polifenoles, y sabemos que los polifenoles presentan efectos antihipertensivos. (Galleano et al., 2010; Lecour et al., 2011; Furuuchi et al., 2012). PFSC se obtiene de la cascarilla del cacao, y los polifenoles del cacao han mostrado efectos antihipertensivos en diferentes estudios (Fraga et al., 2005; Taubert et al., 2007). El efecto antihipertensivo que se ha descrito para los derivados del cacao, se atribuye también a los polifenoles que contienen (Quiñones et al., 2011; Nogueira et al., 2102; Sarriá et al., 2012). Más aún, se sabe que la capacidad antioxidante total del plasma aumenta después de consumir polifenoles de cacao (Serafín et al., 1993; Hermann et al., 2006; Scheid et al., 2010; Davison et al., 2012). Aunque PFSC tiene una cantidad relativamente baja de polifenoles totales, este producto se ha visto que tiene una elevada capacidad antioxidante *in vitro* ( $569 \pm 76 \mu\text{mol TE/g ORAC}$ ), lo que podría justificar su efecto antihipertensivo. Los polifenoles presentan en realidad múltiples efectos beneficiosos sobre la salud, que se han justificado muchas veces por sus propiedades antioxidantes. La relación entre capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva de muchos compuestos parece hoy día evidente. Ya hemos comentado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, que la hipertensión se asocia con un incremento de radicales libres. Estudios clínicos han demostrado que los pacientes hipertensos presentan un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Lacy et al., 1998; Zalba et al., 2004; Paravicini & Touyz, 2008), y una disminución en la capacidad antioxidante (Sagar et al., 1992; Lassègue & Griendling, 2004; Lee

& Griending, 2008; Labiós et al., 2011. La capacidad antioxidante total del plasma puede medirse con distintas técnicas. Una de ellas, es el ensayo fluorimétrico que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral. Esta técnica la han utilizado distintos investigadores y también nuestro grupo de investigación en anteriores estudios. Este ensayo nos proporciona la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo (Oxygen radical absorbance capacity=Capacidad para absorber radicales de oxígeno=ORAC). El valor de ORAC en el plasma de las ratas SHR tratadas por vía intragástrica con 300 mg/kg de PFSC fue mayor ( $10,60 \pm 0,80$   $\mu\text{mol Trolox/ml plasma}$ ) que el valor de ORAC en el plasma de las ratas SHR a las que administrábamos agua por esta vía (control negativo) ( $6,70 \pm 0,57$   $\mu\text{mol Trolox/ml plasma}$ ), y la diferencia entre ambos valores fue significativa. En el organismo, los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las lipoproteínas del plasma, transformándolos en ácidos grasos peroxidados. Estos ácidos grasos peroxidados sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malonildialdehído (MDA). Así pues, el MDA es un buen indicador de la peroxidación lipídica, y su cuantificación plasmática en esta Tesis Doctoral, nos ha permitido también tener una medida bastante real del grado de oxidación que existía en el organismo de las ratas. Los datos encontrados en la bibliografía señalan que los niveles séricos basales de MDA en humanos oscilan entre valores no detectables y valores iguales a 2 mM. Durante la etapa aguda de un infarto de miocardio, y también durante las 24 horas posteriores a un accidente cerebrovascular, estos valores pueden aumentar hasta 20 veces (Bermúdez Pirela et al., 2000). Las ratas SHR del grupo control negativo, a las que administrábamos agua por vía intragástrica, tuvieron niveles plasmáticos

de MDA mayores ( $0,750 \pm 0,002$  nmol/ml plasma) que las ratas SHR tratadas por esta misma vía con 300 mg/kg de PFSC ( $0,723 \pm 0,006$  nmol/ml plasma). Los valores de ORAC y los niveles de MDA en el plasma de estas últimas ratas, avalan, por consiguiente, la idea de que el efecto antioxidante de PFSC, probablemente debido a su contenido en polifenoles, pueda ser responsable, al menos en parte, del efecto antihipertensivo que presenta este compuesto. En esta Tesis Doctoral, también se determinaron los valores de ORAC y los niveles de MDA en el plasma de las ratas SHR tratadas de forma aguda con Captopril. Conocemos la importancia que tiene la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el control de la presión arterial, pero, al iniciar un tratamiento antihipertensivo con inhibidores de la ECA (IECA), no sólo se inhibe esta enzima; se produce además una disminución de los niveles de anión superóxido (Gurer et al., 1999; Baykal et al., 2003). Esto no es extraño, ya que los compuestos IECA inhiben la formación de angiotensina II, y uno de los principales efectos deletéreos de este agente vasoconstrictor es que aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (Rajagopalan et al., 1996; Laursen et al., 1997; Dzau, 2001). Por todo ello, no nos resultó extraño que el valor de ORAC en el plasma de las ratas tratadas por vía intragástrica con 50 mg/kg de Captopril fuese también algo mayor que el valor de ORAC en el plasma de las ratas a las que se les administró agua por vía intragástrica. El nivel plasmático de MDA fue, además, significativamente más bajo en las ratas SHR tratadas por vía intragástrica con 50 mg/kg de Captopril, que el nivel plasmático de este metabolito en las ratas tratadas por vía intragástrica con 300 mg/kg de PFSC.

En la presente Tesis Doctoral, pudimos comprobar que la disminución de la presión arterial que producía PFSC en las ratas SHR, cuando este compuesto se administraba de forma aguda por vía intragástrica, era siempre menor que la disminución de esta variable producida por la administración aguda de 50 mg/kg de Captopril por la misma vía. Hay que tener en cuenta que este fármaco es muy eficaz en el tratamiento de la hipertensión, y que la dosis de este fármaco utilizada en esta Tesis Doctoral, es una dosis que nuestro grupo de investigación ya había caracterizado anteriormente como una dosis muy eficaz en las ratas SHR. En realidad, en su momento, nuestro grupo de investigación realizó ensayos de administración por vía intragástrica de diferentes dosis de Captopril, en las ratas SHR, y pudimos comprobar que 50 mg/kg de este fármaco producían disminuciones de la presión arterial, que podían considerarse máximas, pero que no alteraban llamativamente otras constantes vitales de los animales. Cabe resaltar que el efecto de PFSC sobre la presión arterial de las ratas SHR fue muy duradero, y su efecto se prolongó en general más que el efecto de Captopril. De hecho, con algunas dosis de PFSC, los niveles iniciales de presión arterial sólo se recuperaron cuando habían transcurrido 72 horas desde su administración. Es siempre deseable que los productos que se administran para el control de la presión arterial presenten efectos duraderos, ya que esto permite que su administración sea menos frecuente. Los efectos de PFSC se han evaluado en realidad pensando en la posibilidad de que este producto pueda formar parte en el futuro de algún alimento funcional con efectos antihipertensivos, y sería conveniente que el efecto saludable de este alimento pudiera conseguirse con una frecuencia baja, o al menos no excesiva, de consumo. Es además importante resaltar que en

## DISCUSIÓN

este estudio hemos podido comprobar que PFSC no modifica la presión arterial de las ratas normotensas WKY. Este dato permite prever que PFSC resulte seguro en sujetos normotensos. Su consumo, formando parte de un alimento, sería por lo tanto siempre viable para la población general.

De todas las dosis de PFSC administradas de forma aguda por vía intragástrica, 300 mg/kg fue la que ocasionó mayores disminuciones de la PAS en las ratas SHR. La máxima disminución de esta variable ( $192,0 \pm 4,4$  mm Hg) se observó 6 horas después de administrar 300 mg/kg de PFSC a las ratas. Las dosis de 100 mg/kg de PFSC y de 200 mg/kg de PFSC, también disminuyeron la PAS de las ratas SHR, pero la disminución con estas dosis fue menor que la conseguida con 300 mg/kg de PFSC. Paradójicamente, dosis mayores de 300 mg/kg de PFSC, ocasionaron también disminuciones de la PAS menores que las producidas por esta dosis. En realidad, 400 mg/kg de PFSC y 500 mg/kg de PFSC, ocasionaron disminuciones de la PAS en las ratas muy semejantes a las producidas por 100 mg/kg de PFSC, que fue la dosis más baja de este producto utilizada. La paradoja que hemos observado al administrar por vía intragástrica dosis altas de PFSC a las ratas SHR en nuestro estudio, también nos lleva a pensar que sean los polifenoles los responsables de su efecto antihipertensivo, al menos cuando se administra PFSC de forma aguda. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en ratas SHR con un cacao rico en polifenoles, también demostraron que las dosis más altas de este cacao disminuían menos la presión arterial que otras dosis más bajas (Quiñones et al., 2009). Más aún, algunos estudios recientes de nuestro grupo de investigación, han mostrado

una paradoja similar cuando se administraban a las ratas SHR, por vía intragástrica, distintas dosis de catequina y epicatequina, que son los dos polifenoles mayoritarios del cacao (Quiñones et al., 2009). La dosis más eficaz de catequina para disminuir la presión arterial en estas ratas fue la dosis de 0,5 mg/kg, y la dosis más eficaz de epicatequina en ellas fue la dosis de 6 mg/kg. Tanto las dosis menores, como las dosis mayores de éstos polifenoles, ocasionaron siempre menores disminuciones de la presión arterial en las ratas SHR. La idea, plasmada ya hace tiempo en algunos estudios, de que una cantidad alta de polifenoles puede exhibir propiedades pro-oxidantes en vez de propiedades antioxidantes (Cotelle et al., 2001; Azam et al., 2004; Lahouel et al., 2006), podría explicar la paradoja que hemos comentado sobre los efectos antihipertensivos que presentan distintas dosis de polifenoles. Aunque esta explicación puede resultar algo elemental, y debería corroborarse con más estudios, es por el momento la única idea que nos permite justificar lo que reiteradamente venimos observando cuando estudiamos los efectos de dosis crecientes de distintos compuestos que contienen polifenoles, sobre la presión arterial de las ratas SHR. Así, el efecto antihipertensivo observado en ratas SHR tras la administración aguda, por vía oral, de diferentes dosis de un extracto de la cáscara de granada, que también contiene polifenoles, principalmente ácido elágico, fue también menos acusado que el efecto de otras dosis menores de este extracto (Fernández Vallinas et al., 2012). Más aún, estudios más recientes corroboran la idea de que los polifenoles presentan en ocasiones efectos pro-oxidantes (Maurya et al., 2010; Khan et al., 2012). Nuestro grupo de investigación ha podido comprobar recientemente que también resulta difícil establecer una relación dosis efecto, cuando se evalúa el



efecto antihipertensivo de compuestos que contienen fitoquímicos fenólicos distintos de los polifenoles. Tal es el caso de un extracto de semillas de fresno que hemos estudiado recientemente en ratas SHR en nuestro laboratorio, que contiene mayoritariamente secoiridoides fenólicos tales como la nuzenida y G13 (López Carreras et al., 2012).

Todos los datos anteriormente comentados, indican que los polifenoles pueden ser los principales responsables del efecto antihipertensivo que produce la administración aguda de PFSC en las ratas SHR. Existen otros productos ricos en fibra y polifenoles que también han mostrado efectos antihipertensivos. Podemos destacar el estudio llevado a cabo por Pérez-Jiménez y colaboradores en 2008, con 34 sujetos adultos no fumadores, a los que se les administraban durante 16 semanas 7,5 g diarios de un producto rico en fibra antioxidante de uva. Este producto contenía en realidad 5,3 g de fibra y 1,4 mg de polifenoles. El grupo control del estudio estaba constituido por 9 sujetos no fumadores, que consumían durante el mismo periodo de tiempo una dieta estándar. El producto estudiado ocasionó una disminución significativa del colesterol total (9%) y del colesterol LDL (9%), y también disminuyó la PAS y la PAD (6% y 5%, respectivamente) de los sujetos del estudio. En los sujetos que presentaban hipercolesterolemia, el consumo del producto estudiado, ocasionó además una reducción mayor del colesterol total (14,2%) y del colesterol LDL (11,6%). Pérez-Jiménez y colaboradores, llegaron a la conclusión de que los efectos del producto estudiado eran mejores que los efectos de otras fibras, y que ello se debía a que el producto estudiado, además de fibra, contenía compuestos antioxidantes, como son los polifenoles (Pérez-Jiménez et al.,

2008). Algunos estudios realizados en animales y en humanos con compuestos ricos en fibra dietética, pero que no contienen polifenoles, han demostrado también efectos beneficiosos sobre la PAS. Los comentaremos más adelante en esta Discusión.

No podemos, sin embargo, olvidar que PFSC también contiene teobromina, el principal alcaloide de las semillas de cacao. Aunque PFSC se obtiene a partir de la cascarilla del cacao, y no de sus semillas, la cantidad de teobromina que contiene este producto es 3,4%. La teobromina es capaz de relajar el músculo liso y tiene propiedades vasodilatadoras. En algunas ocasiones se ha utilizado por eso para tratar la hipertensión. Se podría pensar que la teobromina fuese responsable de los efectos antihipertensivos de PFSC, pero la cantidad de teobromina que contiene PFSC no creemos que pueda justificar los efectos antihipertensivos de este compuesto. Hay que tener en cuenta que la disminución de la presión arterial causada por esta base xántica, es dosis dependiente (Kelly et al., 2005; Cooper et al., 2008; van den Bogaard et al., 2010) y, sin embargo, el incremento en la dosis de PFSC, no siempre se acompañó de un efecto mayor sobre la presión arterial de las ratas SHR.

Los polifenoles serían por consiguiente los principales responsables del efecto de PFSC sobre la presión arterial de las ratas SHR. Es cierto que algunos compuestos ricos en fibra dietética, que no contienen polifenoles, han resultado también beneficiosos para el control de la presión arterial en animales y en humanos, pero hay que puntualizar que en los correspondientes estudios, las distintas fibras se administraban de forma continuada, y no tenemos

constancia de que exista hasta este momento ningún otro estudio, distinto del realizado en esta Tesis Doctoral, en el que la administración aguda de una fibra haya ocasionado una disminución significativa de la presión arterial.

Los efectos antioxidantes de los polifenoles pueden ser responsables de sus efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios, antiaterogénicos y moduladores de la apoptosis celular (Ruf et al., 1999; Pérez-Vizcaíno et al., 2002; Pa et al., 2003; Dell'Ágli et al., 2004; Williams et al., 2004; Wilcox et al., 2006; Schroeter et al., 2006; Khalil et al., 2010; Yang et al., 2011; Quiñones et al. 2012). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los polifenoles que se ingieren con la dieta difícilmente pueden ser responsables directos de sus efectos *in vivo*, ya que su biodisponibilidad es usualmente baja. Estos compuestos, se metabolizan rápidamente a otros metabolitos que serían los responsables directos de los efectos atribuidos a los polifenoles (Williams et al., 2004). Estos metabolitos podrían actuar a través de otros mecanismos no relacionados con el efecto antioxidante, que podrían justificar también el efecto vasodilatador y antihipertensivo de los polifenoles.

La ECA es una enzima multifactorial, que está localizada en diferentes tejidos. Esta enzima es responsable de la formación del péptido vasopresor angiotensina II y de la inactivación del péptido vasodilatador bradiquinina, y su actividad puede estar aumentada en patologías como la hipertensión, la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2. La inhibición de la ECA puede, por lo tanto, facilitar el control de la presión arterial en situaciones de hipertensión, y puede también beneficiar otras patologías asociadas a esta enfermedad. De

hecho, los fármacos IECA se consideran un tratamiento de primera elección en pacientes que padecen hipertensión. Algunos estudios han comprobado que los polifenoles pueden inhibir la ECA, y este efecto podría también justificar su efecto vasodilatador y cardioprotector. Concretamente, algunos trabajos han demostrado que los polifenoles son capaces de inhibir la ECA *in vitro* (Wagner et al., 1992; Parker et al., 1999; Cyrino et al., 2002; Aviram et al., 2001; Actis-Goretta et al., 2003, 2006; Liu et al., 2003; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006; Guerrero et al., 2012; Khodja et al., 2012). Actis-Goretta y colaboradores, en 2003, señalaron que los flavan-3-oles y las procianidinas derivadas de (-)-epicatequina, que se aislan del cacao, eran capaces de unirse a la ECA *in vitro*, resultando los hexámeros y los tetrámeros de procianidina mas potentes para inhibir esta enzima, que los monómeros. Este mismo grupo también comprobó, en cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana, que los polifenoles inhibían la formación de angiotensina II, y que la estructura de las procianidinas condicionaba en buena medida la inhibición de la ECA (Actis-Goretta et al., 2003). En estas células, los hexámeros de (-)-epicatequina también inhibían la ECA en mayor medida que los tetrámeros, dímeros y monómeros de (-)-epicatequina (Ottaviani et al., 2006). Otro estudio de Actis-Goretta y colaboradores, realizado en 2006, demostró que distintos alimentos ricos en flavanoles, entre ellos algunos vinos, chocolates y té, eran capaces de inhibir *in vitro* la ECA. Estos alimentos también eran capaces de inhibir la ECA en distintos tejidos, tales como riñones, pulmones y testículos de rata. En el mismo estudio se demostró además, que el vino tinto era más eficaz que el vino blanco para inhibir la enzima, y que el té verde era más eficaz que el té negro para inhibirla. Estos datos se relacionaron con el contenido de

polifenoles y flavanoles de estos alimentos. De hecho, algunos flavonoides presentes en estos alimentos también inhibían la ECA. Así, por ejemplo, las procianidinas inhibían la ECA, pero ni la (+)-catequina, ni la (-)-epicatequina, ni la quercetina, ni el resveratrol, ni otros monómeros de flavonoides eran capaces de inhibirla (Actis-Goretta et al., 2006). Más recientemente, Ojeda y colaboradores han comprobado, sin embargo, que algunas antocianinas, tales como la delfinidina-3-O-sambubiosido y la cianidina-3-O-sambubiosido, inhiben la actividad de la ECA, compitiendo por el sustrato de esta enzima (Ojeda et al., 2010).

Los componentes esenciales del sistema renina-angiotensina están presentes en distintos tejidos como vasos sanguíneos, corazón y riñones, y se sabe que en las ratas SHR, la actividad de la ECA en el tejido vascular está aumentada durante la fase crónica de la hipertensión (Takai et al., 2004). Quisimos por todo ello saber si el compuesto PFSC podía inhibir la ECA en las ratas SHR de nuestro estudio. La actividad de esta enzima en las muestras de plasma de las ratas SHR tratadas de forma aguda, por vía intragástrica, con 300 mg/kg de PFSC, un compuesto que sabemos que tiene polifenoles, fue sin embargo, sólo algo menor ( $118,00 \pm 4,10$  mU ECA/ ml plasma), que la actividad de esta enzima en las muestras de plasma de los animales del grupo control negativo ( $130,31 \pm 3,80$  mU ECA/ ml plasma). Como era de esperar, la actividad de la ECA en las muestras de plasma de las ratas SHR que se habían tratado por vía intragástrica con 50 mg/kg de Captopril, fue mucho menor ( $89,02 \pm 3,15$  mU ECA/ ml plasma), que la actividad de la enzima en las

muestras de plasma de los dos grupos anteriores, existiendo diferencia significativa en ambos casos.

Hasta este momento, hemos comentado el efecto que tuvo la administración aguda, por vía intragástrica, en las ratas SHR, de PFSC y de las otras fibras estudiadas en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, la hipertensión es una patología crónica, que requiere tratamiento continuado. Es decir, lo usual es que la terapia antihipertensiva se prolongue indefinidamente. Por lo tanto, la evaluación de la efectividad antihipertensiva de un compuesto, requiere llevar a cabo estudios en los que dicho compuesto se administre de forma crónica. En base a estas ideas, en esta Tesis Doctoral, nos pareció que resultaba inevitable realizar un estudio en el que se administrase PFSC a las ratas SHR durante un periodo prolongado de tiempo. La posibilidad de administrar ingredientes funcionales, sin efectos adversos, para el tratamiento de la hipertensión, constituye sin lugar a dudas una idea atractiva, y, en último término, con esta Tesis Doctoral, lo que queríamos saber es si la administración continuada de PFSC, podría resultar útil en esta enfermedad. Es decir, si este producto, rico en fibra soluble y que contiene polifenoles, puede ayudar a controlar la presión arterial de las personas que la tienen alterada.

Varios grupos de investigación (Smith & Huntchings, 1979; Sánchez et al., 1986), y también el nuestro (López-Miranda et al., 1998; Civantos et al., 1999; Miguel et al., 2006; Quiñones et al., 2010), han observado que existe un periodo inicial en la vida de las ratas SHR, en el que la presión arterial de estos animales aumenta progresivamente de forma muy marcada (usualmente hasta

las 11-12 semanas de vida). Después de este período, la presión arterial de las ratas SHR sigue aumentando, pero el aumento ya no es tan llamativo. Para Okamoto y Aoki (Okamoto & Aoki, 1963) la presión arterial de las ratas SHR no se estabiliza totalmente hasta que estos animales tienen aproximadamente 20 semanas de vida. Existen, sin embargo, algunas discrepancias temporales entre los distintos grupos de investigación, cuando se intentan caracterizar las fases del desarrollo de hipertensión en las ratas SHR, ya que, para su caracterización, además de las medidas de la presión arterial, pueden utilizarse otros criterios adicionales, tales como medidas de flujo, medidas de las resistencias vasculares periféricas, medidas de la actividad simpática, e incluso la cuantificación de los receptores adrenérgicos. De todos modos, el período comprendido entre las 11 y las 20 semanas de vida, podemos considerar que en principio forma parte de la fase de estabilización de la presión arterial en las ratas SHR. En esta Tesis Doctoral, se seleccionó esta fase de la vida de estos animales para estudiar los efectos de la administración crónica de PFSC. En el estudio, se incluyó un grupo de ratas SHR que, desde las 10 semanas de vida, ingería únicamente agua como producto líquido (control negativo). Los valores de la PAS en este grupo control negativo corroboraron que existe este periodo de estabilización de la presión arterial en las ratas SHR. En realidad, durante el periodo comprendido entre las 11 y las 20 semanas de vida, los valores de la PAS de estas ratas que ingerían agua como producto líquido, no mostraron excesivas diferencias, aunque fueron algo mayores al final que al principio.

En el estudio de administración crónica de PFSC, utilizamos tres grupos de animales tratados con PFSC. Estos grupos recibían, respectivamente, tres

dosis diarias distintas de este compuesto (200 mg/kg de PFSC, 400 mg/kg de PFSC y 800 mg/kg de PFSC). El periodo de tratamiento para todos estos animales, fue el periodo comprendido entre las 10 y las 20 semanas de vida, que, según lo señalado, se adecua al período de estabilización de la presión arterial en las ratas SHR. Las tres dosis de PFSC indicadas, se seleccionaron en base a los resultados obtenidos en el estudio anterior, en el que habíamos administrado de forma aguda distintas dosis de este producto. En el estudio de administración crónica, decidimos incluir también un grupo de ratas SHR a las que administrábamos diariamente 800 mg/kg de BETA-G, una fibra estándar que no había ocasionado efectos sobre la presión arterial de las ratas SHR cuando se administraba de forma aguda, por vía intragástrica, a estos animales. Por último, en el estudio de administración crónica, se incluyó un grupo de ratas a las que administrábamos diariamente 50 mg/kg de Captopril en el agua de bebida (control positivo). Este grupo tratado con Captopril era desde luego muy importante, pues, a igual que cuando estudiábamos el efecto agudo sobre la presión arterial, nos permitía comparar la eficacia de PFSC con la de un fármaco antihipertensivo de eficacia demostrada. No consideramos, sin embargo, necesario incluir en este estudio de administración crónica un grupo de ratas WKY, ya que la administración aguda de PFSC no había ocasionado efecto alguno sobre la presión arterial de estos animales.

En el estudio de administración crónica que estamos comentando, los distintos tratamientos se interrumpieron cuando las ratas tenían 20 semanas de vida. A partir de este momento, todos los animales ingerían únicamente agua en el biberón como producto líquido, y la presión arterial se midió diariamente



durante cuatro semanas más para evaluar la posible reversión del efecto antihipertensivo producido por los distintos tratamientos.

Merece la pena comentar el efecto que tuvieron los tratamientos que administrábamos de forma continuada, sobre el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de las ratas SHR. El peso corporal de todas las ratas SHR aumentó ligeramente desde las 10 hasta las 24 semanas de vida. Es decir, aumentó durante toda la duración del estudio. Muchas fibras son capaces de disminuir el peso corporal. Más aún, un estudio previo con PFSC había producido una disminución del peso corporal en las ratas Zucker obesas (Sánchez et al., 2010a). Sin embargo, todas las ratas SHR incluidas en el estudio de administración crónica que estamos comentando, tuvieron pesos muy semejantes, exceptuando las del grupo que ingería de forma continuada Captopril. Hay, sin embargo, que tener en cuenta que las ratas SHR no son un modelo de obesidad. Los animales de esta raza no presentan sobrepeso, y las ratas SHR adultas pesan incluso menos que sus controles correspondientes, las ratas WKY de su misma edad. Por eso, era difícil que pudieran apreciarse descensos muy llamativos del peso corporal en las ratas SHR con nuestros tratamientos. Pese a ello, en las últimas semanas, el grupo de ratas SHR que ingería diariamente Captopril, mostró valores de peso corporal algo menores que los restantes grupos. Después de haber retirado la administración del fármaco, estos animales continuaron, durante cuatro semanas más, teniendo valores de peso corporal menores que los de las ratas de los restantes grupos. La ingesta sólida de las ratas tratadas diariamente con Captopril fue sin embargo siempre muy semejante a la ingesta sólida de las ratas de los

restantes grupos. No obstante, en otros estudios anteriores, también pudimos comprobar que la administración continuada de Captopril, disminuía el peso corporal de las ratas SHR (Miguel et al., 2006; Quiñones et al., 2010; Sánchez et al., 2010). Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores que también han comprobado que el bloqueo del sistema renina-angiotensina, retrasa la ganancia de peso corporal en este modelo animal (Chow et al., 1997). Por el contrario, la ingesta líquida de las ratas que ingerían la solución de Captopril, fue mayor que la ingesta líquida de las ratas que ingerían agua. Esto tampoco puede sorprendernos, pues se ha demostrado que los IECA proucen sed, y aumentan la ingesta de agua y la cantidad de orina en las ratas. (Cadnapaphornchai et al., 2004). Respecto a los grupos tratados con fibra, cabe resaltar que la ingesta sólida en todos estos grupos fue muy semejante a la ingesta sólida de las ratas que ingerían agua, pero los grupos tratados con mayor cantidad de fibra (800 mg/kg/día de BETA-G o 800 mg/kg/día de PFSC) mostraron una tendencia a beber mayor cantidad de líquido. Ello podría relacionarse con la capacidad que tienen algunas fibras para absorber agua y formar geles. Se ha descrito además que las ratas SHR prefieren las soluciones dulces y saladas (Di Nicolantonio, 2004), y lo que en todo caso interesa resaltar es que las ratas SHR no mostraron ningún rechazo al consumo de PFSC, pese a que este compuesto contiene polifenoles que pueden conferir sabor amargo al alimento. Esto permite prever que PFSC pueda incluirse con éxito en alimentos para el consumo humano.

Centrándonos ya en los resultados obtenidos sobre la presión arterial, hay que señalar que la administración crónica de 400 mg/kg/día de PFSC a las

ratas SHR, ocasionó una disminución significativa de la PAS, que se apreció en estos animales prácticamente desde el momento en el que comenzaron a ingerir este producto en el agua de bebida. El efecto se mantuvo mientras continuó esta ingesta, lo que sugiere que este producto podría servir para controlar la presión arterial también en humanos, formando parte de un alimento funcional de consumo continuado. Hay que tener en cuenta que las disminuciones suaves, pero mantenidas, de la presión arterial, pueden resultar muy ventajosas en los pacientes hipertensos, pues se sabe que los descensos repentinos y excesivos de esta variable, conllevan mayor riesgo de que aparezcan otros problemas distintos de la propia hipertensión. Así, un descenso brusco de la presión arterial, puede facilitar que se produzcan infartos de corazón, y puede asimismo disminuir la probabilidad de supervivencia en los pacientes hipertensos (Cruickshank et al., 1987; Furberg et al., 1995; Psaty et al., 1995). Algunos investigadores sugieren que la variabilidad en los niveles de presión arterial es clínicamente relevante. El grado de fluctuación de esta variable puede contribuir a la aparición de daño orgánico, y puede aumentar el riesgo cardiovascular en pacientes hipertensos (Parati & Mancia, 2001; Pringle et al., 2003).

La administración continuada de 200 mg/kg/día de PFSC, no fue capaz de disminuir la PAS de las ratas SHR y, paradójicamente, tampoco la administración continuada de 800 mg/kg/día de PFSC, consiguió disminuir esta variable en estos animales. Hay, sin embargo, que recordar que también cuando se administraban distintas dosis de PFSC de forma aguda, las dosis mayores presentaban efectos menos acusados en las ratas, que las dosis

intermedias. Tampoco apreciamos una disminución de la PAS en las ratas tratadas diariamente con 800 mg/kg de BETA-G, pero no podemos descartar que otras dosis de este producto, administradas de forma continuada, pudieran haber resultado eficaces sobre la presión arterial de las ratas SHR. Seguimos, sin embargo, pensando, que la eficacia antihipertensiva de PFSC en las ratas SHR, está relacionada con los polifenoles que contiene este producto, y asimismo pensamos que estos compuestos son los principales responsables de sus efectos, tanto cuando se administra de forma aguda, como cuando se administra de forma crónica. Los polifenoles que contiene PFSC, justificarían que su efecto sobre la presión arterial fuese mejor que el efecto de otras fibras sobre esta variable.

Como era de esperar, los valores más bajos de la PAS en el estudio de administración crónica, se observaron en el grupo de ratas tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril. Ferrone y Antonaccio, en 1979, comprobaron que esta dosis de Captopril, administrada desde el destete, prevenía totalmente el desarrollo de hipertensión en ratas macho SHR (Ferrone & Antonaccio, 1979). En nuestro estudio, los descensos de la presión arterial producidos por 400 mg/kg/día de PFSC, no eran desde luego tan acentuados como los producidos por 50 mg/kg/ día de Captopril, pero, como ya hemos señalado, las disminuciones de la PAS que producía PFSC, fueron también consistentes y mantenidas a lo largo de todo el periodo de tratamiento.

La presión arterial de las ratas SHR tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril, o con 400 mg/kg/día de PFSC, aumentó a partir de las 20 semanas

de vida. Es decir, la PAS de las ratas aumentó al suspender estos tratamientos. La reversión del efecto fue total en el grupo tratado con PFSC. Podemos, por lo tanto, decir que PFSC disminuye la presión arterial mientras se administra, y que el efecto de este compuesto desaparece cuando deja de administrarse. La desaparición de su efecto al cesar la administración, constituye también una prueba de su bioactividad. De hecho, la bioactividad de otros ingredientes alimentarios también se ha corroborado evaluando sus efectos después de retirar un tratamiento continuado con ellos. Así, el grupo de Sipola et al., comprobó que el efecto antihipertensivo de un producto lácteo fermentado, desaparecía cuando este producto se dejaba de administrar (Sipola et al., 2001). Asimismo, nuestro grupo de investigación ha podido comprobar que la presión arterial de las ratas SHR se recupera también después de interrumpir el tratamiento continuado con otros ingredientes antihipertensivos. Entre ellos, una leche fermentada (Miguel et al., 2005), un hidrolizado de huevo (Miguel et al., 2006) y un cacao rico en polifenoles (Quiñones et al., 2010). Por otra parte, un estudio piloto realizado por nuestro grupo de investigación en 2010, con ratas SHR recién destetadas, puso de manifiesto que el consumo diario de 0,75 g de PFSC en el agua de bebida, atenuaba el desarrollo de hipertensión en estos animales. El efecto sobre la presión arterial se mantenía hasta las 20 semanas de vida, y desaparecía también cuándo las ratas dejaban de ingerir PFSC (Sánchez et al., 2010b). En un estudio realizado en ratas Zucker obesas, la dieta enriquecida en un 5% de PFSC sólo ocasionó, por el contrario, una disminución muy pequeña de la PAS y de la PAD, pero hay que tener en cuenta que las ratas Zucker obesas no son un modelo de hipertensión, ya que la hipertensión en estos animales solo aparece cuando tienen edad avanzada

(Sánchez et al., 2010a). En realidad, estos animales suelen presentar valores de presión arterial menores que los de las ratas Zucker delgadas hasta que alcanzan las 12 semanas de vida, y en nuestro estudio el tratamiento comenzaba con ratas Zucker obesas de 8 semanas de vida y duraba sólo 6 semanas más.

Los datos que aportan otros investigadores, corroboran por otra parte los resultados que obtuvimos al retirar el tratamiento de 50 mg/kg/día de Captopril a las ratas. En este caso, la reversión del efecto fue parcial, y la presión arterial de las ratas SHR que se habían tratado con el fármaco, aumentó al dejar de administrarlo, pero fue siempre menor que la de las ratas de los restantes grupos. Kost y colaboradores, en el año 2000, observaron que después de administrar Captopril, durante 8 semanas, a las ratas SHR, la retirada de este fármaco ocasionaba sólo la reversión parcial de su efecto, y 4 semanas después de suspender esta administración, la presión no se había recuperado totalmente (Kost et al., 2000). Poco después, Paull y Widdop llevaron a cabo un estudio en el que administraban alternativamente, durante 4 semanas, los siguientes tratamientos a las ratas SHR: Perindopril (1 mg/kg/día), Candesartán cilexetil (2 mg/kg/día), o Hidralacina (30 mg/kg/día). La eficacia de los tres tratamientos fue similar, y su retirada ocasionó una reversión completa del efecto, excepto en el caso del tratamiento con Perindopril, en el que la suspensión del fármaco ocasionó una reversión parcial. Este trabajo puso de manifiesto que la continuidad del efecto no era la misma cuando se inhibe la ECA y cuando se bloquean los receptores AT1 de angiotensina (Paull & Widdop, 2001). Parece, por lo tanto, que el efecto de los inhibidores de la ECA

sobre la presión arterial es muy persistente. Sin embargo, cabe pensar que en nuestro estudio, quizá podríamos haber conseguido una reversión total del efecto antihipertensivo de Captopril, si después de retirar este fármaco, hubiéramos prolongado más el periodo en el que medíamos la presión arterial, o si hubiéramos utilizado una dosis menor de Captopril.

La presencia de polifenoles en PFSC creemos que es fundamental para poder justificar sus efectos antihipertensivos, pero también es cierto que PFSC ha mostrado efectos beneficiosos sobre otros factores de riesgo cardiovascular, distintos de la hipertensión, que podrían resultar también beneficiosos para el control de la presión arterial. En las ratas SHR de esta Tesis Doctoral, PFSC ocasionó, de hecho, una disminución significativa de la glucemia, que pudo observarse en las ratas tratadas con 400 mg/kg/día de este producto, al final del tratamiento. Más aún, la retirada del tratamiento con 400 mg/kg/día de PFSC, ocasionó también una reversión de sus efectos sobre la glucemia. Los datos obtenidos al analizar el efecto de PFSC sobre la glucemia de las ratas SHR, no pueden sorprendernos demasiado. De hecho, en el estudio realizado con ratas Zucker obesas, que hemos mencionado anteriormente en esta Discusión (Sánchez et al., 2010a), nuestro grupo de investigación pudo comprobar que la dieta enriquecida con un 5% de PFSC disminuía también la glucemia y la insulina de estos animales. Esta dieta ocasionaba en ellos además una disminución de los índices HOMA-IR y HOMA- $\beta$  (índices de resistencia a la insulina y de funcionamiento de las células  $\beta$ -pancreáticas, respectivamente), y producía, por el contrario, un aumento del índice QUICKI

(índice de sensibilidad a la insulina) (Sánchez et al., 2010a) y de los niveles plasmáticos de adiponectina (Sánchez et al., 2011).

En las ratas SHR de esta Tesis Doctoral, PFSC mejoró también el perfil lipídico. Este producto había ocasionado ya anteriormente efectos beneficiosos sobre el colesterol y los triglicéidos en distintos estudios experimentales. Así, en un estudio llevado a cabo por Ramos y colaboradores, en 2008, con ratas Sprague-Dawley de 10 semanas de vida, alimentadas con una dieta rica en colesterol, se comprobó que PFSC disminuía el colesterol y los triglicéidos de estas ratas. PFSC produjo también una disminución de la ingesta sólida y del peso corporal en ellas (Ramos et al., 2008). Nuestro grupo de investigación demostró también, en 2010, que la administración continuada de la dieta enriquecida con un 5% de PFSC, disminuía el índice de riesgo cardiovascular (Colesterol HDL/Colesterol total) en las ratas Zucker obesas. Sin embargo, estos animales muestran mayores niveles basales de colesterol y triglicéidos que las ratas SHR. Así, las ratas Zucker obesas de 15 semanas de vida del estudio realizado en 2010 (Sánchez et al., 2010a), tenían niveles basales de colesterol total y triglicéidos de  $155,00 \pm 6,63$  mg/dl y de  $556,22 \pm 40,60$  mg/dl, respectivamente, y las ratas SHR de esta Tesis Doctoral tenían niveles basales de colesterol total y triglicéidos de  $45,40 \pm 2,10$  mg/dl y de  $41,50 \pm 1,60$  mg/dl, respectivamente. Estos valores de colesterol y triglicéidos, son bastante parecidos a los obtenidos por otros investigadores en ratas macho SHR no tratadas (Bustamante et al., 2001).



En esta Tesis Doctoral, se observó también una disminución de la glucemia, el colesterol y los triglicéridos en las ratas SHR de 20 semanas de vida que se habían tratado con 800 mg/kg/día de BETA-G, pese a que este compuesto no había modificado la presión arterial. No hay, sin embargo, que olvidar, que el betaglucano de cebada ha mostrado efectos hipoglucemiantes e hipolipemiantes en otros estudios realizados con animales y humanos, que hemos citado anteriormente en esta Discusión.

Algunas de las fibras que ocasionan efectos beneficiosos sobre la glucemia y el perfil lipídico, han mostrado también capacidad para controlar la presión arterial en animales y humanos, cuando se ingieren de forma continuada. Así, Obata y colaboradores, en 1998, comprobaron que el *Psyllium*, una fibra soluble derivada de la cáscara de la semilla de *Plantago ovata*, mejoraba la glucemia, el perfil lipídico y la presión arterial de las ratas Stroke-Prone espontáneamente hipertensas (SP-SHR). Estos investigadores llevaron a cabo un estudio con 4 grupos de ratas SP-SHR, de 6 semanas de vida, que recibían respectivamente cuatro dietas distintas: dieta estándar, dieta enriquecida con un 3% de *Psyllium*, dieta enriquecida con un 10% de *Psyllium* y dieta enriquecida con un 10% de celulosa. Todos los grupos ingirieron un 0,05% de sal en el agua de bebida durante un mes. Al final de este periodo, los animales alimentados con las dietas enriquecidas en *Psyllium* mostraron una disminución significativa de la presión arterial, cuando se compararon con los alimentados con la dieta estándar o la dieta enriquecida en celulosa. Las dietas enriquecidas en *Psyllium* provocaron además una disminución del peso del ventrículo izquierdo en las ratas SP-SHR, y disminuyeron también la relación

sodio/potasio en las heces de estos animales. Este grupo de investigación propuso que la dieta enriquecida en *Psyllium* absorbía el sodio, y facilitaba así su excreción en heces (Obata et al., 1998). Unos años después, Li y colaboradores, llevaron a cabo un estudio en ratas Goto-Kakizaki, que son un modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 2. Estos investigadores dividieron las ratas Goto-Kakizaki en 3 grupos, a los que administraron, durante 16 semanas, tres tipos distintos de dietas, compuestas respectivamente por centeno, arroz blanco y almidón de maíz. La presión arterial se medía cada 4 semanas en las ratas. Desde la semana 12 de ingesta, la primera de estas dietas disminuyó significativamente la PAS de los animales, y además esta dieta, que estaba compuesta por centeno, disminuyó en ellos los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL. Estos investigadores concluyeron que la ingesta de fibra podía tener efectos beneficios sobre la presión arterial, y también sobre los lípidos sanguíneos. Además, sugirieron que las dietas ricas en fibra podían administrarse en pacientes con diabetes *mellitus*, para prevenir las complicaciones de esta enfermedad (Li et al., 2004). Un año después, Galisteo y colaboradores llevaron también a cabo un estudio con ratas Zucker obesas alimentadas durante 25 semanas con una dieta enriquecida en fibra, que contenía un 3,5% de *Plantago ovata*. Se pudo comprobar que el consumo de *Plantago ovata* prevenía la disfunción endotelial, la hipertensión y el desarrollo de obesidad en las ratas Zucker obesas. Esta fibra mejoraba además en ellas la dislipidemia y las concentraciones anormales de adiponectina y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Galisteo et al., 2005). Como hemos señalado anteriormente, nuestro grupo de investigación estudió en su momento los efectos que ocasionaba una dieta que contenía un 5% de

PFSC en las ratas Zucker obesas de 8 semanas de vida. Seis semanas después, estos animales mostraron una disminución muy pequeña de la PAS y de la PAD, que no fue significativa, pero ya hemos señalado en esta Discusión que las ratas Zucker obesas no son hipertensas. Las diferencias entre nuestros resultados de presión arterial en ratas Zucker, y los de Galisteo y colaboradores, en 2005, podrían estar más relacionadas con la duración del tratamiento y la edad de los animales, que con los efectos de los productos estudiados.

La ingesta continuada de algunas fibras también ha ocasionado efectos beneficiosos sobre la presión arterial en humanos, que muchas veces se acompañaba de un efecto beneficioso sobre otros factores de riesgo cardiovascular. Hace ya tiempo, el estudio *Dietary Approaches to Stop Hypertension* señaló que las dietas con un alto contenido en fibra, y bajo contenido en sal y grasas, disminuían los niveles de presión arterial en humanos (Sacks et al., 1995). En realidad, los efectos de la fibra de avena sobre la presión arterial se empezaron a estudiar algunos años después de haber establecido sus efectos hipocolesterolemiantes. Así, el grupo de Saltzman, en el año 2001, estudió los efectos de una dieta hipocalórica que contenía fibra de avena sobre la hipertensión, la dislipidemia y el sobrepeso. Estos investigadores comprobaron que la dieta rica en avena no disminuía significativamente el peso corporal de los hombres y mujeres incluidos en el estudio, pero esta dieta ocasionaba una disminución de la PAS, sin cambios en la PAD, y disminuía también el colesterol total y el colesterol LDL en los sujetos del estudio. Los beneficios conseguidos con la dieta hipocalórica rica en avena

sobre la PAS y sobre el perfil lipídico, fueron además mayores que los producidos con el consumo de una dieta hipocalórica que no contenía avena (Saltzman et al., 2001). Posteriormente, el grupo de Keenan, en 2002, comprobó que la presión arterial de un grupo de 18 pacientes, hombres y mujeres, hipertensos no tratados, que presentaban valores leves de hipertensión o que se consideraban prehipertensos (PAS=130-160 mm Hg, PAD=80-100 mm Hg y al menos una medida mayor de 140-90 mm Hg), disminuía cuando se les administraba, durante 6 semanas, una dieta enriquecida en betaglucano de avena. Se mantenía durante este periodo un consumo estandarizado de 5,5 g/día de betaglucano. En estos sujetos, la PAS disminuía 7,5 mm Hg y la PAD disminuía 5,5 mm Hg, pero el grupo control de este estudio, que consumía menos de 1 g/día de fibra total, no mostró cambios en la PAS ni en la PAD. Los pacientes que consumían la dieta rica en betaglucano mostraron también cierta mejoría en la sensibilidad insulínica y, como era previsible, una significativa reducción del colesterol total (9%) y del colesterol LDL (14%) (Keenan et al., 2002). Ese mismo año, también se comprobó que cuando se consumían diariamente suplementos de cereales de avena integral, se podía reducir la medicación antihipertensiva de pacientes hipertensos tratados, que tenían niveles basales de presión arterial menores de 160-100 mm Hg. Su presión arterial mejoraba a pesar de la reducción en la medicación (Pins et al., 2002). El estudio de Davy y colaboradores, en 2002, no pudo, sin embargo, demostrar que el consumo de avena disminuía la presión arterial de sujetos hipertensos (Davy et al., 2002). No obstante, He y colaboradores, en 2004, volvieron a confirmar los efectos beneficiosos de la fibra soluble de avena en un grupo de pacientes hipertensos con hipertensión

de grado 1. A estos pacientes, se les administró la fibra soluble de avena durante 12 semanas, y se pudo comprobar que esta fibra producía en ellos una disminución significativa de la PAS y de la PAD (3,4 mm Hg y 3,2 mm Hg, respectivamente) (He et al., 2004). Un metanálisis publicado un año después también concluyó que el aumento del consumo de fibra en la dieta era capaz de reducir la presión arterial en pacientes hipertensos (Whelton et al., 2005).

Algunas fibras distintas del betaglucano de avena, también han mostrado claros efectos sobre la presión arterial en humanos. En 2001, el grupo de Burke propuso que los niveles altos de presión arterial se podían asociar en general a un menor consumo de proteínas, y posiblemente también a un menor consumo de fibra. Estos investigadores demostraron que una dieta alta en proteínas de soja y *Psyllium*, ocasionaba una disminución de la presión arterial en un grupo de pacientes hipertensos que recibían tratamiento antihipertensivo. Los efectos de las proteínas y de la fibra eran aditivos, y se consiguieron disminuciones de la PAS de 5 mm Hg cuando se administraban las proteínas de soja y el *Psyllium* de forma conjunta (Burke et al., 2001). Más aún, Jenkins y colaboradores, en 2002, comprobaron que la ingesta de algunas fibras, como *Psyllium*, podía producir pequeñas disminuciones de la presión arterial en pacientes hiperlipidémicos con valores normales de presión arterial (Jenkins et al., 2002). Lee y colaboradores, en 2009, sugirieron también que la sustitución de los carbohidratos de la dieta por proteína y fibra, podía reducir la presión arterial. Estos investigadores llevaron a cabo un estudio con un pan rico en harina de altramuz, y comprobaron que su ingesta reducía 3 mm Hg la PAS de mujeres y hombres con sobrepeso, que tenían niveles de PAS

menores de 150 mm Hg y niveles de PAD menores de 95 mm Hg (Lee et al., 2009). Más recientemente, Kochar y colaboradores, llevaron a cabo un amplio estudio, en el que controlaron, durante 16 años, la presión arterial de 13.368 hombres, con una edad media de  $52,4 \pm 8,9$  años. Como resultado del estudio, estos investigadores concluyeron que un desayuno con cereales de grano entero, reducía el riesgo de desarrollar hipertensión en hombres de mediana edad (Kochar et al., 2012).

La tabla 19 muestra algunos estudios que han evaluado los posibles efectos antihipertensivos de diferentes fibras dietéticas, distintas de la fibra soluble de cacao, desde el año 1998, hasta este momento.

**Tabla 19.** Efectos sobre la presión arterial de la administración continuada de diferentes fibras.

Tipo de fibra	Sujeto del estudio	Efecto sobre la presión arterial	Referencia
Cáscara de la semilla de <i>Psyllium</i>	Ratas Stroke-Prone espontáneamente hipertensas (SP-SHR)	↓PAM	<i>Obata et al., 1998</i>
Avena	Sujetos normotensos	↓PAS	<i>Saltzman. et al., 2001</i>
Dieta alta en proteína de soja y <i>Psyllium</i>	Pacientes hipertensos	↓PAS	<i>Burke et al., 2001</i>
Avena	Pacientes hipertensos	No modifica	<i>Davy et al., 2002</i>
betaglucano y <i>Psyllium</i>	Sujetos normotensos	↓PAM	<i>Jenkins et al., 2002</i>
betaglucano de avena	Sujetos prehipertensos	↓PAS ↓PAD	<i>Keenan et al., en 2002</i>
Cereales de avena integral	Pacientes hipertensos	↓PAM	<i>Pins et al., 2002</i>
Fibra soluble de avena	Pacientes hipertensos	↓PAS ↓PAD	<i>He et al., 2004</i>
Centeno	Ratas Goto-Kakizaki	↓PAS	<i>Li et al., 2004</i>
<i>Plantago ovata</i>	Ratas Zucker obesas	↓PAM	<i>Galisteo et al., 2005</i>
Varios tipos de fibra	Pacientes hipertensos	↓PAM	<i>Whelton et al., 2005</i>
Fibra antioxidante de uva	Sujetos normotensos	↓PAS ↓PAD	<i>Pérez-Jiménez et al., 2008</i>
Harina de altramuz	Sujetos prehipertensos	↓PAS	<i>Lee et al., 2009</i>
Grano de cereales en el desayuno	Hombres normotensos	↓Riesgo hipertensión	<i>Kochar et al., 2012</i>

PAS = Presión arterial sistólica; PAD = Presión arterial diastólica; PAM = Presión arterial media

Por lo tanto, también otras fibras distintas de la fibra soluble de cacao, pueden disminuir la presión arterial cuando se administran de forma

continuada. Los efectos antihipertensivos de PFSC, se apreciaron, sin embargo, también cuando este producto se administró de forma aguda y, según señalamos anteriormente, creemos que están prioritariamente relacionados con la presencia de polifenoles en él, y con la capacidad antioxidante que presentan estos compuestos. Otros mecanismos también podrían estar implicados en el efecto antihipertensivo de PFSC, especialmente cuando este producto se administra de forma crónica. Algunos de estos mecanismos, podrían jugar asimismo un papel relevante en el efecto antihipertensivo que presentan también otras fibras cuando se ingieren de forma continúa.

Los mecanismos por los que PFSC produce una disminución de la presión arterial cuando se administra de forma aguda, pueden desde luego diferir de los mecanismos que facilitan que disminuya esta variable cuando este producto se administra de forma crónica. De hecho, la capacidad antioxidante del plasma (ORAC) de los animales tratados crónicamente con PFSC, que habían acusado descensos de la presión arterial, no aumentó, pese a que, tras el tratamiento antihipertensivo agudo con este producto, las ratas tratadas habían tenido mayores valores de ORAC que las del grupo control. Algunos investigadores consideran, sin embargo, que en los estudios crónicos con antioxidantes, la medida de la capacidad antioxidante del plasma podría no ser un buen marcador del efecto antioxidante que presenta el compuesto, durante el tratamiento. Esta medida no sería muy idónea como marcador antioxidante, especialmente si los animales se someten a un período de ayuno antes de la toma de las correspondientes muestras plasmáticas (Pérez-Jiménez et al.,



2009). Desde luego, los animales de nuestro estudio, habían permanecido durante al menos 12 horas en ayuno antes de ser sacrificados.

La concentración plasmática de MDA de las ratas SHR tratadas con 400 mg/kg/día de PFSC ( $0,55 \pm 0,0123$  nmol MDA/ml plasma), fueron de todos modos más bajas que la concentración de este metabolito en el plasma de los animales que ingerían agua ( $0,84 \pm 0,0901$  nmol MDA/ml plasma). Cuando se retiró el tratamiento con PFSC, los niveles plasmáticos de MDA aumentaron además de forma significativa ( $0,91 \pm 0,0644$  nmol MDA/ml plasma). Así pues, los valores plasmáticos de MDA de las ratas tratadas de forma continua con PFSC, indican que estos animales presentan una disminución en la peroxidación lipídica, y esto avala, en último término, los efectos antioxidantes de PFSC.

El glutatión es una pequeña molécula, compuesta por tres aminoácidos (ácido glutámico, glicina y cisteína), que funciona como un agente reductor no enzimático. Esta proteína está controlada homeostáticamente, tanto fuera como dentro de la célula, de forma que se utiliza y regenera para mantener niveles adecuados disponibles en todo momento. Puede considerarse el principal antioxidante intracelular, y su déficit puede implicar la muerte de las células. El glutatión existe en dos formas: la activa o reducida, y la forma oxidada que es inactiva. La forma oxidada, o inactiva, raramente sobrepasa el 10% de la concentración total de glutatión, y la vulnerabilidad celular aumenta cuando los niveles de glutatión reducido representan menos del 90% de la concentración total de glutatión. La relación glutatión reducido/glutatión oxidado

puede considerarse, un indicador claro del estrés oxidativo, ya que el glutatión reducido es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres (Schulz et al., 2000; Valko et al., 2008). Como bien sabemos, las especies reactivas de oxígeno, que se generan en la mitocondria, y que también provienen de distintos contaminantes ambientales, son altamente reactivas, y si no se neutralizan, dañan o destruyen en milisegundos distintos componentes celulares, tales como la membrana celular, los ácidos nucleicos y las proteínas. La producción de glutatión es sobre todo importante en el hígado. Allí, esta molécula se utiliza para conjugar compuestos tóxicos, permitiendo así que se excreten del organismo. Desde el hígado, el glutatión reducido puede exportarse a otras partes del organismo, siempre y cuando sus niveles sean los adecuados. Se sabe que los polifenoles son capaces de aumentar la expresión de la  $\gamma$ - glutamilcisteina sintetasa (Cao et al., 1998; Li et al., 2006; Soyalan et al., 2011; Li et al., 2012), enzima limitante en la síntesis de glutatión. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral revelaron, sin embargo, que la administración continuada de 400 mg/kg/día de PFSC no era capaz de aumentar los niveles hepáticos de glutatión reducido en las ratas SHR. Los animales que se habían tratado crónicamente con 400 mg/kg/día de PFSC mantuvieron valores similares de glutatión reducido 4 semanas después de retirar el tratamiento. La medida del glutatión hepático, no nos permitió, por lo tanto, corroborar los efectos antioxidantes de PFSC en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, los valores hepáticos de MDA, resultaron algo menores en las ratas tratadas diariamente con 400 mg/kg de PFSC ( $0,0005 \pm 0,00002 \mu\text{mol MDA}/\mu\text{g}$  proteína en tejido), que en las ratas que habían ingerido diariamente agua ( $0,0006 \pm 0,00006 \mu\text{mol MDA}/\mu\text{g}$  proteína en tejido). Cuatro semanas después

de haber retirado el tratamiento con 400 mg/kg de PFSC, los valores hepáticos de MDA aumentaron significativamente en las ratas. Por lo tanto, la medida de este metabolito en el hígado de las ratas tratadas, al igual que su medida en el plasma, si que nos permite pensar que los efectos sobre la presión arterial del tratamiento crónico con PFSC puedan estar relacionados, al menos en parte, con el efecto antioxidante de este compuesto.

Por otra parte, hay que señalar que la actividad de la ECA tampoco se modificó de forma significativa en el plasma de las ratas SHR que acusaban un descenso de la presión arterial con el tratamiento crónico de PFSC. La actividad de esta enzima tampoco se había modificado en el plasma de las ratas que, tras el tratamiento agudo con este producto, acusaban descensos de la presión arterial. Como ya señalamos, y como era de esperar, la actividad de la ECA disminuyó en los animales tratados de forma aguda con Captopril, pero la actividad de esta enzima fue paradójicamente mucho mayor en el plasma de las ratas tratadas crónicamente con este fármaco, que en el plasma de las ratas que ingerían crónicamente agua. El incremento en la actividad plasmática de la ECA tras un tratamiento crónico con Captopril, no nos ha sorprendido demasiado, ya que la disminución prolongada de la presión arterial conlleva siempre mecanismos compensadores que intentan elevar esta variable. De hecho, se ha descrito, tanto en ratas como en humanos, que durante el tratamiento con fármacos que inhiben la ECA, la actividad plasmática de esta enzima aumenta (Fyhrquist et al., 1980; Boomsma et al., 1981; Wu & Ding, 2001). Curiosamente, algunos trabajos anteriores de nuestro grupo, también demostraron que la actividad de la ECA aumentaba en el plasma de las ratas

SHR después de un tratamiento crónico con Captopril (Miguel et al., 2007; Quiñones et al., 2010). Los estudios de Costerousse et al., en 1998, en ratas, relacionan el aumento de los niveles circulantes de la ECA, durante el tratamiento con inhibidores de esta enzima, con un aumento generalizado en la transcripción del gen correspondiente y un incremento de su síntesis en las células somáticas (Costerousse et al., 1998). Todas estas modificaciones pueden constituir una respuesta adaptativa cuando se inhibe la ECA, aunque esta respuesta parece que es independiente de la supresión en la formación de angiotensina II. Las consecuencias de la inducción de la ECA, durante la inhibición de esta enzima, se desconocen todavía, pero no parece que reduzcan el efecto terapéutico de los fármacos que la inhiben. Es cierto además que otros mecanismos distintos de la inhibición de la ECA podrían justificar el efecto terapéutico de los inhibidores de esta enzima (Takai et al., 2004).

Como hemos comentado anteriormente, los mecanismos por los que PFSC ocasiona una disminución de la presión arterial cuando se administra de forma aguda y cuando se administra de forma crónica, podrían desde luego no ser exactamente los mismos. Se han propuesto además algunos otros mecanismos para justificar el efecto de los polifenoles, que aún no hemos analizado. Algunos de estos mecanismos podrían estar implicados, al menos en parte, en los efectos antihipertensivos de PFSC. Distintos trabajos han demostrado el efecto vasodilatador de los polifenoles. La relajación vascular que producen los polifenoles se ha relacionado con un incremento en las enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa

y la glutatión peroxidasa (Bagchi et al., 2003; Frombaum et al., 2011;). Los polifenoles disminuyen, por el contrario, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Bradamante et al., 2004). También promueven un incremento en la síntesis de óxido nítrico (NO), que puede asimismo ser responsable de su efecto vasodilatador (Ruft, 1999; Benito et al., 2002; Duarte et al., 2004; Williams et al., 2004; Actis-Goretta et al., 2006; Perez-Vizcaíno et al., 2006; Zhang et al., 2008; Khoo et al., 2010; Botden et al., 2012; Furuuchi et al., 2012). Su efecto se ha relacionado además con el incremento en la síntesis del guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Andriambeloson et al., 1999), y con la inactivación de fosfodiesterasas (Mattagajasingh et al., 2007; Quiñones et al., 2012) y la inhibición de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (McKenna et al., 1996; Li et al 2000; Wang et al., 2011; Lei et al., 2012). También hay que recordar que los polifenoles tienen efectos antiinflamatorios, antiaterogénicos y antitrombóticos que pueden potenciar sus efectos beneficiosos sobre el tono vascular (López-Sepúlveda et al., 2008; Mulvihill et al., 2010; Nohl et al., 2011; López-Sepúlveda et al., 2011; Quiñones et al., 2013).

En esta Tesis Doctoral, consideramos por todo ello adecuado estudiar el efecto de PFSC en preparaciones de tejido arterial, para comprobar si este compuesto era capaz de relajar este tejido. Asimismo, intentamos averiguar a qué podía deberse dicha relajación. Más concretamente, llevamos a cabo algunos ensayos con PFSC en anillos de aorta de ratas SHR, que no habían recibido ningún tratamiento. Esta preparación es fácil de manejar y, aunque esta arteria es una arteria de conductancia, los resultados en ella siempre

proporcionan información muy valiosa para interpretar los efectos que tiene un compuesto sobre la presión arterial. En primer lugar, comprobamos que PFSC era capaz de relajar los anillos de aorta, y vimos que se conseguía una relajación máxima del  $49,3 \pm 7,5\%$  con la concentración  $10^{-3}$  mg/ml de PFSC en el baño de órganos. Quisimos después analizar si esta relajación era endotelio dependiente, y si podía relacionarse con la liberación endotelial de prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) o NO, que son los dos factores relajantes vasculares más importantes que libera el endotelio. Algunos estudios recientes, ya constatados en la Introducción de esta Tesis Doctoral, han señalado que el aumento en la actividad de la eNOS está mediado, al menos en parte, por la sirtuina-1 (SIRT-1), que es una desacetilasa moduladora del metabolismo energético y de múltiples funciones en el organismo (Yamamoto et al., 2007). Se ha demostrado que algunos polifenoles aumentan la expresión y/o la actividad de la eNOS mediada por SIRT-1, pero, en el momento actual, se debate aún si los polifenoles son, en realidad, capaces de activar directamente la SIRT-1 (Quiñones et al., 2013). En base a toda esta información, consideramos interesante ensayar los efectos de PFSC en distintos tipos de preparaciones de anillos de aorta: preparaciones intactas, preparaciones sin endotelio, preparaciones con endotelio preincubadas con  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) inhibidor de la NOS, e inhibidor por consiguiente de la síntesis de NO, preparaciones con endotelio preincubadas con Indometacina, inhibidor de la ciclooxigenasa, e inhibidor por consiguiente de la síntesis de  $\text{PGI}_2$ , preparaciones con endotelio preincubadas con Sirtinol, inhibidor de SIRT-1, e inhibidor por consiguiente de la expresión y/o la actividad de la eNOS mediada por esta desacetilasa, preparaciones con endotelio preincubadas con

dimetilsulfóxido (DMSO) (compuesto utilizado para disolver el Sirtinol) y preparaciones sin endotelio preincubadas con DMSO.

Antes de analizar los resultados obtenidos en todas las preparaciones de anillos de ahora, hay que comentar que, en esta Tesis Doctoral, también se estudiaron los efectos de L-NAME, Indometacina y Sirtinol, sobre la presión arterial de las ratas SHR, y asimismo se estudió la modificación del efecto antihipertensivo de PFSC por estos compuestos. Para ello, llevamos a cabo distintos ensayos en las ratas. En unos, administrábamos a los animales, por vía oral, mediante sonda intragástrica, 300 mg/kg de PFSC, dosis que ocasionaba el efecto máximo de este compuesto. La presión arterial se medía seis horas después de la administración de PFSC, momento en el que este compuesto producía los descensos máximos de esta variable. En otros ensayos, cuatro horas después de la administración de PFSC, se administraban, alternativamente, por vía intraperitoneal, 30 mg/kg de L-NAME, 5 mg/kg de Indometacina o 1 mg/kg de Sirtinol. También realizamos ensayos, en los que cuatro horas después de administrar PFSC a las ratas, inyectábamos, por vía intraperitoneal, a estos animales, 1 ml de suero salino o 1 ml de una solución de DMSO al 10%. La solución de DMSO al 10% y el suero salino fueron en realidad los disolventes utilizados para disolver el Sirtinol o los restantes compuestos. Comentaremos conjuntamente los resultados obtenidos en las preparaciones de aorta, y los obtenidos en estos ensayos que acabamos de mencionar, realizados *in vivo*.

PFSC relajó las preparaciones de los anillos de aorta, de las ratas SHR, que tenían el endotelio intacto (relajación máxima=49,4 ± 7,5%), pero pudimos comprobar que este compuesto no relajaba prácticamente las preparaciones de la aorta de estos animales que no tenían endotelio (relajación máxima=18,3 ± 2,8%). La relajación que ocasionaba PFSC disminuía además en las preparaciones que se habían incubado con L-NAME (30,9 ± 4,7%), pero la relajación de PFSC en las preparaciones incubadas con Indometacina (54,4 ± 7,0%) fue, sin embargo, muy semejante a la relajación que producía este compuesto en las preparaciones no tratadas, que tenían el endotelio intacto. Estos datos, obtenidos *in vitro*, indicaban que el efecto de PFSC era endotelio dependiente, y que el NO estaba implicado en su efecto. Los datos obtenidos *in vivo*, también avalaron esta idea. La administración de L-NAME ocasionaba un ligero incremento de la presión arterial en las ratas SHR (13,5 ± 6,3 mm Hg). La disminución de los niveles basales de NO, producida por este fármaco, podría justificar estos resultados. Sin embargo, lo más importante es que el efecto antihipertensivo que producía PFSC, tras su administración aguda, por vía intragástrica, no se observaba cuando se administraba cuatro horas después el inhibidor de la NOS. La Indometacina no modificó, sin embargo, la PAS de las ratas SHR, y este fármaco tampoco modificó el efecto producido por PFSC. Podemos, por lo tanto, descartar que la liberación endotelial de PGI<sub>2</sub> colabore de forma importante al efecto antihipertensivo de PFSC. Los datos obtenidos en los estudios *in vivo* nos permiten, sin embargo, afirmar que la liberación de NO está implicada en los efectos antihipertensivos de este compuesto. Algunos investigadores demostraron ya hace tiempo que los suplementos de fibra podían mejorar la función endotelial en pacientes y animales hipertensos



(Ascherio et al., 1992; Roberts et al., 2002; Grassi et al., 2005; Martins et al 2007).

Los resultados obtenidos en las preparaciones de aorta, y también los obtenidos en los ensayos con ratas SHR, indicaron además que la SIRT-1 estaba implicada en la liberación de NO producida por PFSC. De hecho, en presencia de Sirtinol, un inhibidor de esta desacetilasa, la relajación arterial producida por PFSC fue menor ( $29,9 \pm 5,2\%$ ) que la relajación obtenida en preparaciones que no se habían incubado con ningún fármaco. Su efecto sobre la presión arterial, aunque sin diferencia significativa, fue también algo menor en los animales tratados con Sirtinol (disminución de  $24,1 \pm 6,7$  mm Hg), que en sus controles correspondientes.

Para esclarecer mejor como actúa PFSC, es sin embargo necesario que tengamos en cuenta también las medidas de la actividad de la eNOS en ratas tratadas crónicamente con este compuesto. Hay que tener en cuenta que en las ratas SHR que se habían tratado de forma crónica con 400 mg/kg/día de este producto, la actividad plasmática de la eNOS (medida como  $\text{ABS}_{450} \text{eNOS}_{\text{fosforilada}} / \text{ABS}_{450} \text{eNOS}_{\text{total}}$ ) aumentaba de forma significativa. Podemos por ello concluir, que en las ratas SHR, los efectos antihipertensivos de PFSC están relacionados con un incremento en la liberación de NO, y también que presumiblemente este producto aumenta la actividad de la eNOS mediada por SIRT-1. Por sus propiedades antioxidantes, PFSC podría evitar asimismo la degradación del NO por las especies reactivas de oxígeno, mejorando también la biodisponibilidad de este mediador. En realidad, no podemos olvidar que las

propiedades antihipertensivas de los polifenoles están muy relacionadas con su capacidad para reducir el estrés oxidativo (Duarte et al., 2001; Villar et al., 2002; Sabu et al., 2002; Negshi et al., 2004; Peng et al. 2005, Ciocoiu et al., 2009; Denis et al., 2013). Estos compuestos favorecen la producción de NO y/o mejoran su biodisponibilidad (Emura et al., 2007; Yamamoto et al., 2008; Ichimura et al., 2006; Mukai & Sato, 2009).

Creemos que se han cumplido los Objetivos de esta Tesis Doctoral y, en último término, los resultados obtenidos en ella nos permiten afirmar que PFSC presenta propiedades antioxidantes y antihipertensivas. Este producto podría incluirse como ingrediente en un alimento funcional útil para la prevención y/o el control de la presión arterial. Sin embargo antes de la utilización comercial de éste producto, serán necesarios estudios que demuestren la seguridad de PFSC en la población general y su eficacia en pacientes hipertensos.



## **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. De todos los productos estudiados (almidón hi-maize 260, beta glucan 0,75 mm, chitosan 95 y un producto rico en fibra soluble de cacao), únicamente el producto rico en fibra soluble de cacao (PFSC) es capaz de disminuir la presión arterial de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), cuando se administra de forma aguda, por vía oral, pero la eficacia antihipertensiva de este producto en estos animales es menor que la de Captopril, y el incremento en la dosis de PFSC no se acompaña siempre con un aumento de su efecto antihipertensivo.
2. El efecto de PFSC sobre la presión arterial es además específico de la condición de hipertensión, y no se observa en las ratas Wistar-Kyoto, que son el control normotenso de las ratas SHR.
3. El perfil de la actividad antihipertensiva de PFSC en las ratas SHR, cuando se administran distintas dosis de este producto, es semejante al de otros productos que contienen polifenoles. Esto sugiere que la disminución de la presión arterial que se observa en las ratas SHR cuando se administra PFSC, está relacionada con los polifenoles que contiene este producto (un 2,24%).
4. El efecto antihipertensivo de PFSC en las ratas SHR es bastante duradero, y este compuesto también es capaz de mantener niveles menores de presión arterial en ellas cuando se administra de forma continuada. La administración crónica de Captopril es, sin embargo, más

## CONCLUSIONES

eficaz para controlar la presión arterial de las ratas SHR, que la administración crónica de PFSC, y la administración continuada de beta glucan 0,75 mm (BETA-G), no modifica, por el contrario, la presión arterial de estos animales.

5. PFSC y BETA-G muestran efectos hipoglucemiantes en las ratas SHR, y disminuyen también el colesterol total y los triglicéridos en estos animales, cuando se administran de forma continuada
6. Las propiedades antioxidantes de PFSC podrían justificar en parte sus efectos antihipertensivos en las ratas SHR, ya que este compuesto aumenta en ellas la capacidad antioxidante del plasma y disminuye sus niveles de peroxidación lipídica.
7. El efecto antihipertensivo de PFSC, que se aprecia en las ratas SHR cuando se administra de forma continuada, desaparece cuando se retira el tratamiento. Al suspender el tratamiento con PFSC, dejan de apreciarse también sus efectos sobre la glucemia, el perfil lipídico y los niveles de malonildialdehído. La reversión de sus efectos al retirar el tratamiento, corrobora la bioactividad de PFSC.
8. Los efectos antihipertensivos de PFSC en las ratas SHR no están relacionados con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.
9. PFSC presenta efectos relajantes vasculares, endotelio dependientes, que pueden observarse en la aorta de las ratas SHR, cuando este tejido se expone a concentraciones de PFSC comprendidas entre  $10^{-6}$  mg/ml y  $10^{-3}$

mg/ml. El efecto vasodilatador de PFSC está además mediado, al menos en parte, por óxido nítrico (NO).

10. PFSC promueve la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial, que está mediada por la sirtuina-1, en las ratas SHR, con el consiguiente incremento en la síntesis de NO, y este mecanismo puede justificar sus efectos vasodilatadores y antihipertensivos en estas ratas
11. PFSC reduce el estrés oxidativo en las ratas SHR, y posiblemente elimina las especies reactivas de oxígeno que degradan el NO en estos animales, mejorando así en ellos la biodisponibilidad de este mediador. Por lo tanto, las propiedades antioxidantes de PFSC podrían justificar también sus efectos vasodilatadores y antihipertensivos en las ratas SHR.
12. Los datos de ingesta y peso corporal obtenidos en las ratas SHR que se trataban de forma continuada con PFSC, indican que este producto tiene unas características nutricionales y organolépticas adecuadas para formar parte de un alimento. Teniendo en cuenta la bioactividad de PFSC, demostrada en esta Tesis Doctoral, se concluye finalmente que este producto podría incluirse como ingrediente en un alimento funcional, útil para la prevención y/o el control de la hipertensión. Antes de la utilización comercial de este alimento funcional, serán sin embargo necesarios estudios que demuestren la seguridad de PFSC en la población general y su eficacia en pacientes hipertensos.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abumweis SS, Jew S, Ames NP.**  $\beta$ -glucan from barley and its lipid-lowering capacity: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64(12):1472-1480.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG .** Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(1):229-234.
- Ahlquist RP.** A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948;153:586-600.
- Alhenc-Gelas F, Tsai SJ, Callahan KS, Campbell WB, Johnson AR.** Stimulation of prostaglandin formation by vasoactive mediators in cultured human endothelial cells. *Prostanlandins* 1982; 24:723-742.
- Aller EE, Abete I, Astrup A, Martinez JA, van Baak MA.** Starches, sugars and obesity. 2011; 3(3):341-69.
- Aller R, de Luis, AD, Izaola O, La Calle F, del Olmo L, Fernández L, Arranza T, Hernández JMG.** Effect of soluble fiber intake en lipid and glucose levels en healthy subjects: A randomised Clinical Trial. *Diabetes Res Clin* 2004;65:7-11
- American Association of Cereal Chemists (AACC).** The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 2001; 46:112-129.
- Anraku M, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, Tsuchiya D, Nishio H, Maruyama T, Otagiri M, Maezaki Y, Kondo Y, Tomida H.** The antioxidative and antilipidemic effects of different molecular weight chitosans in metabolic syndrome model rats. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(12):1994-1998.
- Artiss JD, Brogan K, Brucal M, Moghaddam M, Jen KLC.** The effects of a new soluble dietary on weight gain and selected blood parameters in rats. *Metab Clin Experim* 2006;55:195-292
- Athanasios Papathanasopoulos MD, Camilleri MD.** Dietary Fiber Supplements: Effects in Obesity and Metabolic Syndrome and Relationship to Gastrointestinal Functions. *Gastroenterology* 2010; 138: 65–72.

- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM.** Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and apigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro* 2004; 18:555-561.
- Babio N, Balanza R, Basulto J, Bulló M, Salas-Salvadó J.** Dietary fibre: influence on body weight, glucemic control and plasma cholesterol profile. *Nutr Hosp* 2010; 25:327-340.
- Baenziger NL, Force LE, Becherer PR.** Histamine stimulates prostacyclin synthesis in cultured human umbilical vein cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 92:1435-1444.
- Bařgarin EK, Pogožheva AV.** Influence of chitosan on clinical-biochemical rates and protein metabolism of patients with cardiovascular diseases. *J Vet Sci* 2009; 10(2):141-146.
- Bakker BM, van Eunen K, Jeneso JA, van Riel NA, Bruggeman FJ, Teusink B.** Systems biology from micro-organism to humans diseases: the role of detailed kinetic models. *Biochem Soc Trans* 2010; 38:1294-1301.
- Banegas JR.** Evaluation of stroke risk in patients with hypertension. *Med Clin (Barc)* 2005; 125:254-256.
- Barkitt DP, Walker AR, Painter NS.** Dietary fiber and disease. *JAMA* 1974; 229:1068-1074.
- Battin EE, Brumaghim JL.** Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2009; 55:1-23.
- Bays H, Frestedt JL, Bell M, Williams C, Kolberg L, Schmelzer W, Anderson JW.** Reduced viscosity Barley  $\beta$ -Glucan versus placebo: a randomized controlled trial of the effects on insulin sensitivity for individuals at risk for diabetes mellitus. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 16:8-58.
- Bazzano LA, Serulda MK, Liu S.** Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2003; 5:492-499.

- Belobrajdic DP, King RA, Christophersen CT, Bird AR.** Dietary resistant starch dose-dependently reduces adiposity in obesity-prone and obesity-resistant male rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2012; 25;9(1):93.
- Blagosklonny MV.** An anti-aging drug today: from senescence promoting genes to anti-aging pill. *Drugs Discovery Today* 2007; 12:218:224.
- Boomsma F, Debruyn JHB, Derkx FHM, Schalekamp MADH.** Opposite effects of captopril on angiotensin I-converting enzyme activity and concentration: relation between enzyme inhibition and long-term blood pressure response. *Clin Sci* 1981; 60:491-498.
- Borhani NO, Mercuri M, Borhani PA, Buckalew VM, Canossa-Terris M, Carr AA, Kappagoda T, Rocco MV, Schnaper HW, Sower JR, bond MG.** Final outcome results of the multicenter isradepine diuretic atherosclerosis study (MIDAS). A randomised controlled trial. *JAMA* 1996; 276:785-791.
- Botden IP, Oeseburg H, Durik M, Leijten FP, Van Vark-Van Der Zee LC, Musterd-Bhaggoe UM, Garrelds IM, Seynhave AL, Langendonk JG, Sijbrands EJ, Danser AH, Roks AJ.** Red wine extract protects against oxidative-stress-induced endothelial senescence. *Clin Sci* 2012; 123(8):499-507.
- Bourre JM.** Effect of increasing the omega-3 fatty acid in the diets of animals on the animal products consumed by humans. *Med Sci* 2005;21:773-779.
- Brockman DA, Chen X, Gallaher DD.** Consumption of a high  $\beta$ -glucan barley flour improves glucose control and fatty liver and increases muscle acylcarnitines in the Zucker diabetic fatty rat. *Eur J Nutr*. 2012; 11.
- Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM.** Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:30-42.
- Buñag RD.** Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol*. 1973; 34(2):279-282.
- Buñag RD, Butterfield J.** Tail-cuff blood-pressure measurement without external preheating en awake rats. *Hypertenion* 1982; 4:898-903.

- Burke V, Hodgson JM, Beilin LJ, Giangiulioi N, Rogers P, Puddey IB.** Dietary protein and soluble fiber reduce ambulatory blood pressure in treated hypertensive. *Hypertension* 2001; 38:821-826.
- Bustamante C, Restrepo B, Beltran M, Gallego M, Lloango N, Landazuri P, Martinez J.** Estudio preliminar sobre el efecto de la simvastatina en la enzima convertidora de la angiotensina. *Rev Fed Arg Cardiol* 2001; 30:297-302.
- Cabrera Fischer EI.** La adventicia: estado actual del conocimiento. *Rev Argent Cardiol* 2008; 76:58-63.
- Cadnapaphornchai, M.A., Rogachev, B., Summer, S.N., Chen, Y.C., Gera, L., Stewart, J.M. and Schrier, R.W.** Evidence for bradykinin as a stimulator of thirst. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 2004; 286:F875–F880.
- Caito S.** SIRT-1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *Faseb J* 2010; 24:3145-3159.
- Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior LR.** Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* 1998; 128:2383-2390.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA.** Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endotelial vasodilatador function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patiens. *Hypertension* 1997; 30:57-63.
- Cathcart MK, Folcik VA.** Liposygenases and atherosclerosis: protection versus patogénesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1726-1734.
- Chaudhury A, Das S.** Recent Advancement of Chitosan-Based Nanoparticles for Oral Controlled Delivery of Insulin and Other Therapeutic Agents. *PharmSciTech* 2011; 12(1):10–20.
- Chen TY, Chi KH, Wang JS, Chien CL, Lin WW.** Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:643-655.

- Chillo S, Ranawana DV, Pratt M, Henry CJ.** Glycemic response and glycemic index of semolina spaghetti enriched with barley  $\beta$ -glucan. *Nutrition* 2011; 27(6):653-658.
- Choi JS, Kim H, Jung MH, Hong S, Song J.** Consumption of barley beta-glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(7):1004-1013.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA.** Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hipertensión* 1998; 31:643-648.
- Chua KF, Mostoslavsky R, Lombard DB, Pang ww, Saito S, Franco S.** Mammalian SIRT 1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress. *Cell Metab* 2005; 2:67-76.
- Cicero AF, Rosticci M, Veronesi M, Bacchelli S, Strocchi E, Melegari C, Grandi E, Borghi C.** Hemodynamic effects of lactotripeptides from casein hydrolysate in mediterranean normotensive subjects and patients with high- normal blood pressure : a randomized, double-blind, crossover clinical trial. *J Med Food* 2010; 13 :1363-1368.
- Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones MM, Muguera B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A.** Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J Agric Food Chem* 2009; 57:6156-6162.
- Ciocioiu M, Mirón A, Mares L, Tutunaru D, Pohaci C, Groza M, Badescu M.** The effects of Sambucus nigra polyphenols on oxidative stress and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus. *J Physiol Biochem* 2009 ; 65(3):297-304.
- Cohen HY.** Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT-1 deacetylase. *Science* 2004; 305:390-392.
- Cotelle N.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001;1:569-590.



- Cooper KA, Campos-Gimenez E, Jimenez AD, Rytz A, Nagy K, Williamson G.** Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. *J Agric Food Chem* 2008; 56:260–265.
- Cruickshank J, Thorp JM, Zacharias FJ.** Benefits and potential harm of lowering high blood pressure. *Lancet* 1987; 1:581-584.
- Cuevas P, García-Calvo M, cArceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Muñoz-Willery I, Martínez-Coso V, Lamas S, Jiménez-Gallego G.** Correction of hipertensión by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 :1996-2001.
- Czervionke RL, Smith JB, Hoak JC, Fey GL, Haycraft DL.** Use of a radioimmunoassay to study thrombin-induced release of PGI<sub>2</sub> from culture endothelium. *Throm Res* 1979; 12:781-786.
- Dahlöf B, Zanzhetti A, Diez J, Nicholls MG, Yu CM, Barrios V, Aurup P, Smith RD, Johansson M, regaal Study.** Effects of losartan and atenolol on left ventricular mass and neurohormonal profile on patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 2002; 20:1855-1864.
- Dávalos A, Bartolomé B, Suberviola J, Gómez-Cordovés C.** ORAC- fluorescein as a model for evaluating antioxidant activity of wines. *Pol J Food Nutr Sci* 2001; 53:133-136.
- Dávalos A, Miguel M, Bartolomé B, López-Fandiño R.** Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot* 2004; 67:1939-1944.
- Davison G, Callister R, Williamson G, Cooper KA, Gleeson M.** The effect of acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *Eur J Nutr* 2012; 51(1):69-79.

- Davy BM, Melby CL, Beske SD, Ho RC, Dvrath LR, Davy KP.** Oat consumption does not affect resting casual and ambulatory 24-h arterial blood pressure in men with high-normal blood pressure to stage I hypertension. *J Nutr* 2002; 132:394-398.
- De D, Wang W, Lood G.** The change of filtration.index of eruthrocyte malonyldialdehyde and superoxide dismutase in patiens with pregnancy induced hypertension. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1995; 30:662-664.
- De Groot P, Luyken R, Pikaar NA.** Cholesterol-lowering effect of rolled oats. *Lancet* 1963; 2:303-304.
- Dello Staffolo M, Martino M, Bevilacqua A, Montero M, Rodríguez MS, Albertengo L.** Chitosan Interaction with Iron from Yoghurt Using an In Vitro Digestive Model: Comparative Study with Plant Dietary Fibers. *Int J Mol Sci* 2011; 12(7): 4647–4660.
- Denis MC, Furtos A, Dudonné S, Montoudis A, Garofalo C, Desjardins Y, Delvin E, Levy E.** Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One* 2013; 8(1):e53725.
- Di Nicolantonio, R.** Why does the spontaneously hypertensive rat have an exaggerated preference for sweet and salty solutions? *Annual Hypothesis Journal of Hypertension* 2004; 22:1649–1654.
- Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL.** PPARAlpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 2002; 40:866-871.
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J.** Functional food science and defence against reactive axidative species. *Br J Nutr* 1998; 80:S77-S112.
- Donkó a, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geistz M.** Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360:2301-2308.

- Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
- Dröge W, Schipper HM.** Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 2007; 6:361-370.
- Du W, Li WY, Lu R, Fang JY.** Folate and fiber in the prevention of colonrectal cancer : between shadows and the light. *World J Gastroenterol* 2010; 16:921-926.
- Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R.** Wine Polyphenols Stimulate Superoxide Anion Production to Promote Calcium Signaling and Endothelial-Dependent Vasodilatation. *Physiol. Res* 2004; 53: 595-602.
- Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Lüscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M.** Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:149-160.
- Dzau V.** The cardiovascular continuum and renin-angiotensin-aldosterone system blockade. *J Hypertens* 2005; 23:S9-S17.
- Elliott J.** Alpha-adrenoceptors in equine veins: evidence for the presence of both alpha-1 and alpha-2 receptors mediating vasoconstriction. *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20:308-317.
- Eman MA, Gordon AF.** Functional Foods and Nutraceuticals in the Primary Prevention of Cardiovascular Diseases. *J Nutr Metab* 2012; 2012:569486.
- European Food Safety Agency (EFSA).** Regulation (CE) No. 432/2012 of 16 May 2012, establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of a disease risk and to children's development an health, OJEU, L 136/1, 25.5.2012.
- Faraci FM, Brian JE.** Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25:692-703.

- Farzaneh-Far R, Lin J, Epel ES, Harris WS, Blackburn EH, Whooley MA.** Association of marine omega-3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2010; 303:250-257.
- Fernández Vallinas S, López N, Miguel M, Aleixandre A.** Antihypertensive effect of a pomegranate rind extract in spontaneously hypertensive rats. congreso internacional: vascular, inflammation, aging and imaging. Cnic, Madrid, 2012.
- Finkel T.** Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:247-254.
- Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP, Sinclair DA.** The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PloS One* 2008; 3:e2020.
- Flight I, Clifton P.** Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60:1145-1159.
- Folkow B.** "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 1990; 16:89-101.
- Food and Drug Administration (FDA).** Food Labeling: Health Claims; Oats and Coronary Heart Disease. 1997; 62:3584-3601.
- Fortuño A, Oliván S, Belouqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G.** Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 2004; 22:2169-2175.
- Fraga CG, Actis-Goretti L, Ottaviani JI, Carrasquedo F, Lotito SB, Lazarus S, Schmitz HH, Keen CL.** Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin Dev Immunol* 2005; 12:11-17.
- Friedland J, Silverstein E.** A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 1976; 66:416-424.

- Frye RA.** Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir-2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273:793-798.
- Fukumitsu T, Hayashi H, Tokuno H, Tomita T.** Increase in calcium channel current by beta-adrenoceptor agonist in single smooth muscle cells isolated from porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 1990; 100:593-599.
- Furchgott RF, Zawadki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
- Furchgott RF.** Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 1999; 19:235-251.
- Furberg CD, Psaty BM, Meyer JV.** Nifedipine; dose-related increase in patients with coronary heart disease. *Circulation* 1995; 62:1326-1331.
- Furuuchi R, Sakai H, Hirokawa N, Watanabe Y, Yokoyama T, Hirayama M.** Antihypertensive effect of boysenberry seed polyphenols on spontaneously hypertensive rats and identification of orally absorbable proanthocyanidins with vasorelaxant activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76(9):1694-1701.
- Fyhrquist F, Forslund T, Tikkanen I, Gronhagen-Riska C.** Induction of angiotensin I-converting enzyme in rat lung with Captopril (SQ 14225). *Eur J Pharmacol* 1980; 67:473-475.
- Galán M, Miguel M, Beltrán AE, Rodríguez C, García-Redondo AB, Rodríguez-Calvo R, Alonso MJ, Martínez-González J, Salas M.** Angiotensin II differentially modulates cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase expression in adventitial fibroblasts exposed to inflammatory stimuli. *J Hypertens*. 2011; 29(3):529-536.
- Galaris D, Pantopoulos K.** Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45:1-23.
- Galisteo M, Sánchez M, Vera R, González M, Anguera A, Duarte J, Zarzuelo A.** A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of

- endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF- $\alpha$  in obese Zucker rats. *J Nutr* 2005; 135:2399-2404.
- Galleano M, Pechanova O, Fraga CG.** Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11(8): 837-848.
- García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A.** Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398:463-475.
- Granger JP, Alexander BT.** Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 2000; 168:161-168.
- Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C.** Cocoa Reduces Blood Pressure and Insulin Resistance and Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Hypertensives Hypertension. 2005; 46:398-405.
- Graziano Riccioni, Valeriana Sblendorio, Eugenio Gemello, Barbara Di Bello, Luca Scotti, Salvatore Cusenza, Nicolantonio D'Orazio.** Dietary Fibers and Cardiometabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 2012; 13:1524–1540.
- Griendling KK, Sorescu D, Lasségue B, Ushio-Fukai M.** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2175-2183.
- Grover GJ, Koetzner L, Wicks J, Gahler RJ, Lyon MR, Reimer RA, Wood S.** Effects of the Soluble Fiber Complex PolyGlycoPlex on Glucose Homeostasis and Body Weight in Young Zucker Diabetic Rats. *Front Pharmacol* 2011; 2:47.
- Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Muguerza B.** Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by

## BIBLIOGRAFÍA

- Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. PLoS One. 2012; 7(11): e49493.
- Guía Española de la Hipertensión Arterial.** Hipertensión 2005; 22 Supl 2:3-8.
- Haller H.** Endothelial Function. General Considerations. Drugs 1997; 53:1-10.
- Hansson L.** Hypertension guidelines and goals of treatment: role of calcium antagonist. Int J Clin Pract Suppl 2000; 114:41-44.
- Haurani MJ, Pagano PJ.** Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? Cardiovasc Res 2007; 75:679-689.
- He J, Streiffer RH, Whelton PK.** Effect of dietary fiber supplementation on blood pressure: A randomised, double-blind Placebo-controlled trial. J Hypertens 2004; 22:73-80.
- He M, Rob M. van Dam, Rimm E, Hu FB, Qi L.** Whole grain, cereal fiber, bran, and germ intake and the risks of all-cause and CVD-specific mortality among women with type 2 diabetes. Circulation 2010; 121(20): 2162–2168.
- Hermann F, Spieker EL, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Lüscher TF, Riesen W, Noll G.** Dark chocolate improves endothelial and platelet function. Heart 2006; 92:119-120.
- Hong SL.** Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical cord vein. Thromb Res 1980; 18:787-795.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA.** Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature 2003; 425:191-196.
- Hung SC, Yokoyama W, Kim H, Bartley G, Anderson WH, Albers DR, Langhorst ML, Williams DM, Stott W, Turowski M, Young SA.** Effects of cationic

- hydroxyethyl cellulose on dyslipidemia in hamsters. *Agric Chem* 2012; 60 (44):11149-11156.
- Husain A.** The chymase-angiotensin system in humans. *J Hypertens* 1993; 11:1155-1159.
- Ito H, Torri M, Suzuki T.** Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy or spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertension* 1995; 17:803-816.
- Iwata E, Hotta H, Goto M.** Hypolipidemic and bifidogenic potentials in the dietary fiber prepared from Mikan (Japanese mandarin orange: *Citrus unshiu*) albedo. *J.Nutr Sci Vitaminol* 2012; 58(3):175-180.
- James M. Lattimer and Mark D. Haub.** Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients* 2010; 2(12): 1266–1289.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Vuksan V, Vidgen E, Parker T, Faulkner D, Mehling CC, Garsetti M, Testolin G, Cunnane SC, Ryan MA, Corey PN.** Soluble fiber intake at a dose approved by the US Food and Drug Administration for a claim of health benefits: serum lipid risk factors for cardiovascular disease assessed in randomised controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:834-839.
- Joanne S, Allard D, Evelyn Perez D, Sige ZD, D Cabo R.** Dietary Activators of Sirt1. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 299(1): 58–63.
- Jun T, Ke Yan F, Catalano M.** Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hum Hypertens* 1996; 10:305-309.
- Katušić ZS, Cosentino F.** Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular physiology. *News Physiol Sci* 1994; 9:64-67.
- Keenan JM, Pins JJ, Frazel C, Moran A, Turnquist L.** Oat ingestion reduces systolic and diastolic blood pressure in patients with mild or borderline hypertension: a pilot trial. *J Fam Pract* 2002; 51:369.



- Kelly CJ.** Effects of theobromine should be considered in future studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:486-7; author reply 487-488.
- Kerckhoffs DA, Hornstra G, Mensink RP.** Cholesterol-lowering effect of beta-glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when beta-glucan is incorporated into bread and cookies. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:221-227.
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA.** Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 1999; 33:1353-1358.
- Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM.** A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Curr Drug Targets* 2012; 13(14):1738-1749.
- Khodja NI, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB.** Grape-Derived Polyphenols Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Rat Mesenteric Artery: Role of Oxidative Stress and the Angiotensin System. *PLoS One* 2012; 7(2):e32039.
- Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, Patel RP, Parks DA.** Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med*. 2010; 1:49(3):339-347.
- Kishi t, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Dhicokawa H, Takeshita A.** Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanism of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2004; 109:2354-2362.
- Kjeldsen SE, Hedner T, Syvertsen JO, Lund-Johansen P, Hansson L, Lanke J, Lindholm LH, De Faire U, Dahlöf B, Karlberg BE; NORDIL Study Group.** Influence of age, sex and blood pressure on the principal endpoints of the Nordic Diltiazem (NORDIL) Study. *J Hypertens* 2002; 20:1231-1237.
- Knopp RH, Superko HR, Davidson M, Insull W, Dujovne CA, Kwitervich PO, Zavoral JH, Graham K, O'Connor RR, Edelman DA.** Long-term blood

- cholesterol-lowering effects of a dietary fiber supplement. *Am J Prev Med* 1999;17:18-23
- Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J* 1994; 298: 249-258.
- Kobinger W, Pichler L.** Investigation into different types of post- and presynaptic alpha-adrenoceptors at cardiovascular sites in rats. *Eur J Pharmacol* 1980; 65:393-402.
- Kocher J, Gaziano JM, Djoussé L.** Breakfast cereals and risk of hypertension in the Physicians' Health Study I. *Clin Nutr* 2012; 31(1):89-92
- Kost CK Jr, Rominski BR, Herzer WA, Jackson EK, Tofovic SP.** Persistent improvement of cardiovascular risk factors in spontaneously hypertensive rats following early short-term captopril treatment. *Clinical and Experimental Hypertension* 2000; 22:127-143.
- Kritchevsky D.** Dietary fibre and lipid metabolism. *Int J Obes* 1987; 11:33-43.
- Kumar KV, Das UN.** Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 1993; 19:59-66.
- Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Navarro B.** Effects of telmisartan on oxidative stress and antioxidant activities in peripheral leukocytes from hypertensive patients. *Publicado en Hipertensión* 2011; 28:48-54.
- Lahouel M, Amedah S, Zellagui A.** The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Thérapie* 2006; 61:347-355.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann I, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG.** Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111:1201-1209.
- Lands et al., 1967 Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ.** Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci* 1967; 6:2241-2249.

- Langer SZ, Shepperson NB.** Prejunctional modulation of noradrenaline release by alpha-2 adrenoceptors: physiological and pharmacological implications in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:S35-S40.
- Lassègue B, Griendling KK.** Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 2004; 17(9):852-860.
- Lattka E, Illig T, Heinrich J, Koletzko B.** FADS gene cluster polymorphisms: important modulators of fatty acid levels and their impact on atopic diseases. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009; 2:119-128.
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG.** Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 99:588-593.
- Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD.** Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:841-853.
- Lecour S, Lamont KT.** Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2011; 11(14):1191-1199.
- Lee MY, Griendling KK.** Redox Signaling, Vascular Function, and Hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(6):1045–1059.
- Lee YP, Mori TA, Puddey IB, Sipsas S, Ackland TR, Beilin LJ, Hodgson JM.** Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:766-772.
- Lepor H, Kaplan SA, Klimberg I, Mobley DF, Fawzy A, Gaffney M, Ice K, Dias N.** Doxazosin for benign prostatic hyperplasia: long-term efficacy and safety in hypertensive and normotensive patients. The multicenter study group. *J Urol* 1997; 157:525-530.
- Li HF, Chen SA, Wu SN.** Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2000; 45:1035-1045.

- Li J, Wang J, Kaneko T, Qin LQ, Sato A.** Effects of fiber intake on the blood pressure, lipid, and heart rate in Goto Kakizaki rats. *Nutrition* 2004; 20:1003-1007.
- Liang X, Lin Y, Cheng Y.** Changes in plasma endothelin-1 and lipid peroxidate levels and amount of superoxide dismutase in red blood cell in patients with pregnancy-induced hypertension. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1996; 31:220-222.
- Lipsky H, Gloger M, Frishman WH.** Dietary fiber for reducing blood cholesterol. *J Clin Pharmacol* 1990; 30:699-703.
- Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T.** Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 2005; 97:967-974.
- López Carreras N, Fernández Vallinas S, Miguel M, Aleixandre A.** Short-term antihypertensive effect of an aqueous seed extract of *fraxinus excelsior L.* in spontaneously hypertensive rats. 22th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection. Londres, 2012.
- López-Miranda V, Civantos B, Blasco R, Fernández R, Aleixandre MA.** Parathyroid hormone and calcitriol in the hypertension caused by dietary calcium deficiency in rats. *J Vasc Res* 1998; 35:397-404.
- López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjeldsen S, Lechat P, Torp-Pedersen C, Priori SG, Alonso García MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Fernández Burgos E, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Ardissino D, Avendano C, Blomström-Lundqvist C, Clément D, Drexler H, Ferrari R, Fox KA, Julian D, Kearney P, Klein W, Köber L, Mancía G, Nieminen M, Ruzillo W, Simoons M, Thygesen K, Tognoni G, Tritto I, Wallentin L;** Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology; Comité de la ESC para la elaboración de las Guías de Práctica Clínica. Expert Consensus document on angiotensin

- converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol.* 2004; 57:1213-1232.
- López-Sepúlveda R, Gómez-Guzmán M, Zarzuelo MJ, Romero M, Sánchez M, Quintela AM, Galindo P, O'Valle F, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jiménez R.** Red wine polyphenols prevent endothelial dysfunction induced by endothelin-1 in rat aorta: role of NADPH oxidase. *Clin Sci* 2011; 120(8):321-333.
- López-Sepúlveda R, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Sánchez M, Gómez-Guzmán M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J.** Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2008; 51(4):1088-1095.
- Lorenzo et al.** Interés y aplicaciones del biopolímero quitosan en tecnología farmacéutica (I). Características físico-químicas y biológicas. *Industria Farmacéutica.* Noviembre /Diciembre 1994, pp 71-75.
- Lorenzo et al.** Interés y aplicaciones del biopolímero quitosan en tecnología farmacéutica (II). Aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. *Industria Farmacéutica.* Enero /Febrero 1995, pp 49-52.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275.
- Luo J, Nikolaev AY, Imasi S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W.** Negative control of p53 by SIRT-2-alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; 107:137-138.
- Maenishi O, Ito H, Suzuki T.** Acceleration of hypertensive cerebral injury by the inhibition of xanthine-xanthine oxidase system in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19:461-477.
- Malinski T, Kapturczak M, Dayhsh J, Bohr D.** Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:654-658.
- Manso MA, Miguel M, Even J, Hernandez R, Aleixandre MA, López-Fandiño R.** Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative

status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 2008;109:361-367.

**Marín-García J, Goldenthal MJ.** The mitochondrial organelle and the heart. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:1293-1310.

**Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC.** Review article: omega-3 fatty acids a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31:679-692.

**Mattagajasingh I, Cuk-Seong K, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, DeRicco J, Kasuno K, Irani K.** SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:14855–14860.

**Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, DeRicco J, Kasuno K, Irani K.** SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 11:104(37):14855-14860.

**Maurya DK, Devasagayam TP.** Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(12):3369-3373.

**McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E, Daly CJ.** New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* 2005; 90:469-475.

**McKeown N.M, Meigs JB, Liu S, Wilson PWF, Jacques PF.** Whole-grain intake is favourably associated with metabolic risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:390-398.

**Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, Martelli E, Terrinoni A, Amati F, Vasa-Nicotera M, Ippoliti A, Novelli G, Melino G, Lauro R, Federici M.** MicroRNA

## BIBLIOGRAFÍA

- 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation* 2009; 120(15):1524-1532.
- Miatello R, Vázquez M, Renna N, Cruzado M, Zumino AP, Risler N.** Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2005; 18(6):864-870.
- Miguel M, Manso MA, Aleixandre MA, López-Fandiño R.** Angiotensin converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after short- and long-term intake of an egg white hydrolysate. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51:555-563.
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG.** Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad? *Antiox Redox Signal* 2006; 8:1113-1120.
- Moncada S, Higgs A, Furchgott R.** XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev* 1997; 49:137-142.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
- Moncada S, Vane JR.** Prostacyclin and its clinical applications. *Ann Clin Res* 1984; 16:241-252.
- Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-méneur C.** Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic b cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2005; 2:105-117.
- Moulay L.** ES 2 277 516 A1, 1 de Julio de 2007. Natraceutical S.A., Proceso para preparar un extracto de cacao altamente soluble.
- Mulvany MJ.** Mechanical and other factors involved in vascular injury related to hypertension. *Blood Press Suppl* 1994; 1:11-17.
- Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E.** Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008; 40:180-196.

- Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates JN, Harrison DG.** Vasorelaxant properties of the endothelium derived relaxant factors more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990; 345:161-164.
- Nicolosi R, Bell SJ, Bistrian BR, Greenberg I, Forse RA, Blackburn GL.** Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeasts. *Am J Clin* 1999; 70:208-212.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Flacone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO.** Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by including the expression of eNOS. *Science* 2005; 310:314-317.
- Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M.** Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1997; 30:405-408.
- Nogueira Lde P, Knibel MP, Torres MR, Nogueira Neto JF, Sanjuliani AF.** Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight. *Int J Hypertens*. 2012; 147321.
- Nose K.** Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull* 2000; 23:897-903.
- Obata K, Ikeda K, Yamasaki M, Yamori Y.** Dietary fiber, psyllium, attenuates salt-accelerated hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1998; 16:1959-1964.
- Okamoto K, Aoki K.** Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27:282-293.
- Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y.** Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43:571-579.



- Ou B, Hampsch-Woodil M, Prior RL.** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49:4619-4626.
- Ozben T.** Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007; 96:2181-2196.
- Pallás M, Verdaguer E, Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Camins A.** Recent Patents on CNS. *Drugs Discovery* 2008; 3:61-69.
- Palmer RM, Moncada S.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:348-352.
- Pandey S, Gujrati VR, Chandravati, Sanger KC.** Status of free radicals and their scavenging enzymes in pregnancy induced hypertension (PIH). *Boll Chim Farm* 1996; 135:472-476.
- Parati G, Mancia G.** Blood pressure variability as a risk factor. *Blood pressure monitoring* 2001; 6:341-347.
- Paravicini TM, Touyz RM.** NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31(2):S170-S180.
- Paull JR, Widdop RE.** Persistent cardiovascular effects of chronic renin-angiotensin system inhibition following withdrawal in adult spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 19(8):1393-1402.
- Pepine CJ.** The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1998; 82:23-27.
- Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio E, García-Díez L, Goñi I, Saura-Calixto F.** Effects of grape antioxidant fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 2008; 24:646-653.

- Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto F.** Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum Nutr.* 2009; 64:102-107.
- Perez-Vizcaíno F, Duarte J, Andriantsitohaina R.** Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006, 40(10):1054-1065.
- Peserico A, Simone C.** Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* 2011; 371832.
- Pins JJ, Geleva D, Keenan JM, Frazel C, O'Connor PJ, Cherney LM.** Do whole-grain oat cereals reduce the need for antihypertensive medications and improve blood pressure control? *J Fam Pract* 2002; 51:353-359.
- Potente M, Dimmeler S.** NO Target SIRT-1: A novel signalling network in endothelial senescence. *Arteriosclerosis, Thromb and Vasc Biol* 2008; 28:1577-1579.
- Potente M, Ghaeni L, Bladessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejana E, Alt FW, Zeiher AM, Dimmeler S.** SIRT-1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 2007; 21:2644-2658.
- Pringle E, Philips C, Thijs L, Davidson C, Staessen JA, de Leeuw PW, Jaaskivi M, Nachev C, Parati G, O'Brien ET, Tuomilehto J, Webster J, Bulpitt CJ, Fagard RH.** Systolic blood pressure variability as a risk factor for stroke and cardiovascular mortality in the elderly hypertensive population. *J Hypertens* 2003; 21:2251-2257.
- Psaty BM, Hechbert SR, Koepsell TD, Siscovick DS, Lemaitre R, Smith NL, Wahl PW, Wagner EH, Furberg CD.** The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapy. *JAMA* 1995; 274:620-625.
- Queenan KM, Stewart ML, Smith KN, Thomas W, Fulcher RG, Slavin JL, Andriambeloson E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R.** Mechanism of

- endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 33:248-254.
- Queenan KM, Stewart ML, Smith KN, Thomas W, Fulcher RG, Slavin JL.** Concentrated oat beta-glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomised controlled trial. *Nutr J* 2007; 26:6.
- Quiñones M, Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Laghi S, Miguel M, Aleixandre A.** Long-term intake of CoccoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertension rats. *Food Chemistry* 2010; 112:1013-1019.
- Quiñones M, Miguel M, Muguerza B, Aleixandre A.** Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct* 2011; 2(11):649-653.
- Quiñones M, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A.** Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res* 2011; 64(5):478-481.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A.** Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 2013; 68(1):125-131.
- Ramos S, Moulay L, Granado-Serrano AB, Vilanova O, Muguerza B, Goya L, Bravo L.** Hypolipidemic effect in cholesterol-fed rats of a soluble fiber-rich product obtained from cocoa husks. *J Agric Food Chem* 2008;56:6985-6993
- Ramos SC, Fonseca FA, Kasmass SH, Moreira FT, Helfenstein T, Borges NC, Moreno RA, Rezende VM, Silva FC, Izar MC.** The role of soluble fiber intake in patients under highly effective lipid-lowering therapy. *Nutr J* 2011; 10:80.
- Reid JL.** Central alpha-2 receptors and the regulation of blood pressure in humans. *J Cardiovascular Pharmacol* 1985; 7:S45-S50.
- Rhodin JA.** Microscopic anatomy of the pulmonary vascular bed in the cat lung. *Microvasc Res* 1978; 15:169-193.
- Rideout TC, Harding SV, Jones PH, Fan MZ.** Guar gum and similar soluble fibers in the regulation of cholesterol metabolism: Current understandings and future research priorities. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4(5):1023–1033.

- Ripsin CM, Keenan JM, Jacobs DR, Elmer PJ, Welch RR, Van Horn L, Liu K, Turnbull WH, They FW, Kestin M, Hegsten M, Davidson DM, Davidson MH, Dugan LD, Demark-Wahnefried W, Belings S.** Oat products and lipid lowering. *Journal of the American Medical Association* 1992; 267:3317-3325.
- Robertfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Responder K, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wilttrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Netrinch AM, Meheust A.** Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010; 104:2:S1-63.
- Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ.** Effect of Diet and Exercise Intervention on Blood Pressure, Insulin, Oxidative Stress, and Nitric Oxide Availability *Circulation* 2002; 106: 2530-2532.
- Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P.** Metabolic adaptations through the PGC- $\alpha$  and SIRT-1 pathways. *FEBS Lett* 2008; 582:46-53.
- Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A.** Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev.* 1992; 66:213-22.
- Rondanelli M, Opizzi A, Monteferrario F, Klersy C, Cazzola R, Cestaro B.** Beta-glucan- or rice bran-enriched foods: a comparative crossover clinical trial on lipidic pattern in mildly hypercholesterolemic men. *Aeur Jclin Nutr* 2001 (print).
- Ruf JC.** Wine and polyphenols related to platelet aggregation and antithrombosis. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25:125–131.
- Sabu MC, Smitha K, Kuttan R.** Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol* 2002 ; 83:109-116.
- Sacks FM, Obarzanek E, Windhauser MM, Svetkey LP, Vollmer WM, McCullough M, Karanja N, Lin PH, Stelle P, Proschan M, Evans MA, Appel LJ, Bray GA, Voght TM, Moore TJ for DASH investigators.** Rationale and design of the

## BIBLIOGRAFÍA

- Dietary Approaches to Stop Hypertension Trial (DASH). *Ann Epidemiol* 1995; 5:108-118.
- Sagrada A, Fargeas MJ, Bueno L.** Involvement of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the postlaparotomy intestinal motor disturbances in the rat. *Gut* 1987; 28:955-959.
- Saltzman E, Krupa Das, Lichtenstein AH, Dallal GE, Corrales A, Schaefer EJ, Greenberg AS, Roberts SB.** An oat-containing hypocaloric diet reduces systolic blood pressure and improves lipid profile beyond effects of weight loss in men and women. *J Nutr* 2001; 131:1465-1470.
- Sánchez D, Muguerza B, Moulay M, Hernández R, Miguel M, Aleixandre A.** Highly methoxylated pectin improves insulin resistance and other cardiometabolic risk factors in Zucker fatty rats. *J Agric Food Chem* 2008; 56:3574-3581.
- Sánchez D, Moulay L, Muguerza B, Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A.** Effect of a soluble cocoa fiber-enriched diet in Zucker fatty rats. *J Med Food* 2010a; 13(3):621-628.
- Sánchez D, Quiñones M, Moulay L, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A.** Changes in arterial blood pressure of a soluble cocoa fiber product in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*. 2010b; 58:1493-1501.
- Sánchez D, Quiñones M, Moulay L, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A.** Soluble fiber-enriched diets improve inflammation and oxidative stress biomarkers in Zucker fatty rats. *Pharmacol Res* 2011; 64(1):31-35.
- Saura-Calixto F.** Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *J Agric Food Chem* 1998; 46:4303-4306.
- Scheid L, Reusch A, Stehle P, Ellinger S.** Antioxidant effects of cocoa and cocoa products ex vivo and in vivo: is there evidence from controlled intervention studies?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010; 13(6):737-42.

- Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, Pettinger WA.** Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 219:400-406.
- Scholle JM, Baker WL, Talati R, Coleman CI.** The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Nutr* 2009; 28:517-524.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T.** Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antiox Redox Signal* 2008; 10:1115-1126.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J.** Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267(16):4904-4911.
- Shadoshima J, Akaike N, Kanaide H, Nakamura M.** Cyclic AMP modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in cultured smooth muscle cells of rats aortas. *Am J Physiol* 1988; 255:H754-H759.
- Slavin JL.** Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 2005; 21:411-418.
- Smith KN, Queenan KM, Thomas W, Fulcher RG, Slavin JL.** Physiological effects of concentrated barley beta-glucan in mildly hypercholesterolemic adults. *J Am Coll Nutr.* 2008; 27(3):434-440.
- Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH.** Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:495-500.
- Solá R, Bruckert E, Valls RM, Narejos S, Luque X, Castro-Cabezas M, Doménech G, Torres F, Heras M, Farrés X, Vaquer JV, Martínez JM, Amaraz MC, Anguera A.** Soluble fibre (*Plantago ovata* husk) reduces plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides, insulin, oxidised LDL and systolic blood pressure in hypercholesterolaemic patients: a randomised trial. *Atherosclerosis* 2010; 211:360-367.

- Somoza B, González MC, González JM, Abderrahim F, Arribas SM, Fernández-Alfonso MS.** Modulatory role of the adventitia on noradrenaline and angiotensin II responses. Role of endothelium and AT<sub>2</sub> receptors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:478-486.
- Soyalan B, Minn J, Schmitz HJ, Schrenk D, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C.** Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver. *Eur J Nutr* 2011; 50(2):135-143.
- Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, Kayanoki Y, Tatsumi H, Taniguchi N.** Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effect of glutathione and superoxide dismutases. *J Biochem* 1997; 122:1260-1264.
- Swales JD.** Economics and the treatment of hypertension. *J Hypertens* 1995; 13:1357-1361.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A.** Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998; 97:2222-2229.
- Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Miyazaki M.** Significant target organs for hypertension and cardiac hypertrophy by angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Hypertens Res* 2004; 27:213-219.
- Talati R, Baker WL, Pablonia MS, White CM, Coleman CI.** The effects of barley-derived soluble fiber on serum lipids. *Ann Fam Med* 2009; 7(2):157-63.
- Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42:1075-1081.
- Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schöming E.** *JAMA* 2007;298:49-60.
- Terashvili M, Pratt PF, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder DR.** Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatr Clin North Am* 2009; 53:1029-1037.

- Thondre PS, Henry CJ.** High-molecular-weight barley beta-glucan in chapatis (unleavened Indian flatbread) lowers glycemic index. *Nutr Res.* 2009; 29(7):480-486.
- Tiwari U, Cummins E.** Meta-analysis of the effect of beta-glucan intake on blood cholesterol and glucose levels. *Nutrition* 2011 (print).
- Touyz RM, Schiffrin EL.** Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:1041-1044.
- Touyz RM, Schiffrin EL.** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:339-352.
- Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rats. *Circ Res* 1981; 48:309-311.
- Ülker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U.** Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003; 59:488-500.
- US Food and Drug Administration. FDA Final rule for federal labelling: health claims: oats and coronary heart disease. *Fed Regist*, 1997.
- Valet P, Saulnier-Blache JS.** Metabolic and tropic role of catecholamines in the development of white adipose tissue *Ann Endocrinol* 1999; 60:167-174.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:4484.
- Van den Bogaard B, Draijer R, Westerhof BE, van den Meiracker AH, van Montfrans GA, van den Born BJ.** Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine: a randomized, double-blind crossover trial. *Hypertension* 2010; 56(5):839-846.
- Van Zwieten PA.** Interaction between alpha- and beta- adrenoceptor-mediated cardiovascular effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8:S21-S28.



- Vane JR, Gryglewski RJ, Botting RM.** The endothelial cell as a metabolic and endocrine organ. *TIPS* 1987; 8:491-496.
- Vaziri H.** hSir2 (SIRT-1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001; 107:149-159.
- Wahl M, Schilling L.** Regulation of cerebral blood flow--a brief review. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; 59:3-10.
- Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U.** Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106:1652-1658.
- Walsh AM, Sweeney T, Bahar B, O'Doherty JB.** Multi-Functional Roles of Chitosan as a Potential Protective Agent against Obesity. *PLoS One* 2013; 8(1): e53828.
- Wan Z, Yu W, Chen Y, Dai YT.** Deacetylase SIRT1 and vascular endothelial function. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2012; 18:831-834.
- Wannamethee SG, Whincup PH, Thomas MC, Sattar N.** Associations Between Dietary Fiber and Inflammation, Hepatic Function, and Risk of Type 2 Diabetes in Older Men: Potential mechanisms for the benefits of fiber on diabetes risk. *Diabetes Care* 2009; 32(10):1823–1825.
- Weitzel F, Ursini F, Wendel A.** Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1036:88-94.
- Weksler B, Ley CW, Jaffe BA.** Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A23187. *J Clin Invest* 1978; 62:923-930.
- Westphal CH, Dipp MA, Guarente L.** A therapeutic role of sirtuins in disease of aging? *Trends Biochemical Sciences* 2007; 32:555-560.

- Whelton SP, Hyre AD, Pedersen B, Yi Y, Whelton PK, He J.** Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *J Hypertens* 2005; 23:475-481.
- Wilcox CS.** Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand* 2003; 179:217-223.
- Wolf-Maier K.** Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. *Hypertension* 2004; 43:10-17.
- Wood PJ.** Relationships between solution properties of cereal beta-glucans and physiological effects a review. *Trends in Food Science and Technology* 2002; 13:313-320.
- Woodman OL, Vatner SF.** Coronary vasoconstriction mediated by alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in conscious dogs. *Am J Physiol* 1987; 253:388-393.
- Wright GL, Rankin GO.** Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol* 1982; 243:365-370.
- Wu J, Ding X.** Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2001; 49:501-506.
- Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J.** Sirtuin Functions in Health and Disease. *Molecular Endocrinology* 2007; 21:1745–1755.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW.** Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004; 23(12): 2369–2380.
- Yuan J, Mintes-Dykhouse K, Lou Z.** Ac-Myc-SIRT-1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol* 2005; 185:203-211.
- Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held O, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J.** CHARM Investigators and Committees. *Lancet* 2003; 362:777-781.

- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J.** NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22 (phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1327-1336.
- Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancía G, Dal Palù C, Hansson L, Magnani B, Rahn KH, Reid JL, Rodicio J, Safar M, Eckes L, Rizzini P;** European Lacidipine Study on Atherosclerosis investigators. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation*. 2002; 106:2422-2427.
- Zarzuelo MJ, López-Sepúlveda R, Sánchez M, Romero M, Gómez-Guzmán M, Ungvary Z, Pérez-Vizcaíno F, Jiménez R, Duarte J.** SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: Implications for vascular aging. *Biochem Pharmacol* 2013;pii: S0006-2952(13):00119-6.
- Zee RS.** Redox regulation of sirtuin-1 by S-glutathiolation. *Antiox Redox Signal* 2010; 13:1023-1032.



